
CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE QUELQUES FACTEURS
SUSCEPTIBLES D'INFLUENCER
LA PHAGOCYTOSE DES BACTÉRIES

THÈSE

pour l'obtention du grade de Docteur en Pharmacie
(Diplôme d'Etat)

présentée et soutenue le 8 Juillet 1952

par

André DESVIGNES

Pharmacien

Assistant à la Faculté

Diplômé des certificats de Bactériologie, Sérologie, Hématologie,
Parasitologie et Chimie biologique appliquée

Ex-Interne des Hôpitaux

JURY

Mlle S. LAMBIN

Président

MM. G. VALETTE

Professeur

M. A. GERMAN

Chargé des Fonctions de Maître de Conférences

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE QUELQUES FACTEURS
SUSCEPTIBLES D'INFLUENCER
LA PHAGOCYTOSE DES BACTÉRIES

THÈSE

pour l'obtention du grade de Docteur en Pharmacie
(Diplôme d'Etat)

présentée et soutenue le 8 Juillet 1952

par

André DESVIGNES

Pharmacien

Assistant à la Faculté

Diplômé des certificats de Bactériologie, Sérologie, Hématologie,
Parasitologie et Chimie biologique appliquée

Ex-Interne des Hôpitaux

JURY }	Mlle S. LAMBIN	Président
	MM. G. VALETTE	Professeur
	M. A. GERMAN	Chargé des Fonctions de Maître de Conférences



PERSONNEL DE LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE PARIS

ADMINISTRATION :

M. René FABRE, Doyen, C. ✱, ☉ I. M. DELABY, Assesseur, O. ✱, ☉ I.
M. G. CUVIER, Secrétaire ☉ I.
MM. L. JEANDEL, Rédact. princ. ☉ I. M. E. BUVAT, Commis, ☉ A.
A. QUILLIOT, Rédacteur. M^{lle} M. DENNY, Commis.
M^{me} M.-L. ESPINASSE, Commis. ☉ A.

PROFESSEURS :

MM. FABRE, C. ✱, ☉ I.	Toxicologie.
DELABY, O. ✱, ☉ I.	Pharmacie chimique.
FLEURY, ✱, ☉ I.	Chimie biologique.
PICON, ✱, ☉ I.	Chimie minérale.
MASCRE, ✱, ☉ I.	Botanique.
JANOT, ✱, ☉ I.	Pharmacie galénique.
CHARONNAT, ✱, ☉ I.	Chimie organique.
VALETTE, ✱, ☉ I.	Zoologie appliquée.
BEDEL, ✱, ☉ I.	Législation, Déontologie et Histoire de la Pharmacie.
PARIS, ☉ A.	Histoire naturelle des médicaments simples d'origine végétale.
GUILLOT, ☉ A.	Physique.
GAUTIER, ☉ I.	Chimie analytique.
LAMBIN (M ^{lle}) ☉ I.	Microbiologie.
RAOUL, ☉ A.	} Professeurs sans chaire.
DOMANGE, ☉ I.	
CRÊTE, ☉ A.	
COURTOIS, ✱, ☉ A.	

Doyen honoraire : M. RADAIS, O. ✱, ☉ I.

PROFESSEURS HONORAIRES :

MM. DÉLÉPINE C. ✱, ☉ I. et LEBEAU, C. ✱, ☉ I., Membres de l'Institut.
COUTIERE, O. ✱, ☉ I., BOUGAULT, C. ✱, ☉ I., LUTZ, ✱, ☉ I.,
HÉRISSEY, O. ✱, ☉ I., LAUNOY, O. ✱, ☉ I., SOMMELET, O. ✱, ☉ I.

MAÎTRES DE CONFÉRENCES :

MM. MORETTE, ✱, ☉ A.	Sciences physiques et chimiques.
CAVIER, ☉ A.	Sciences naturelles.
TRUHAUT, ✱, ☉ I.	Sciences physiques et chimiques.
MOREAU, ☉ A.	Sciences physiques et chimiques.
GUY	Sciences physiques et chimiques.
N.	Sciences naturelles.

CHEFS DES TRAVAUX PRATIQUES :

MM. CORRIEZ, ☉ I.	Physique.
HARISPE, ☉ A., travaux pratiques première année	Chimie générale et pharmaceutique.
DEYSSON	Botanique.
GERMAN	Microbiologie.
GIRARD, ☉ A.	Chimie biologique.
MANGEOT, ☉ A.	T.P. quatrième année.
PIETTE, ☉ A.	Biologie animale.
RENAULT H.	Chimie analytique.

INSTITUT DE PHARMACOTECHNIE ET DE PHARMACODYNAMIE

MM. QUEVAUVILLER, ☉ A.	Pharmacodynamie.
GOUTAREL	Pharmacotechnie galénique.
WAROLIN	Pharmacotechnie chimique.
Bibliothécaire en chef	M. GARNIER, ✱, ☉ I.
Bibliothécaires	M ^{lle} LAVAUD, ☉ I.
	M ^{me} KREHMER.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41550412_0007

A la mémoire de mon regretté Maître

Monsieur le Doyen A.SARTORY

Professeur de Microbiologie

A Mademoiselle S. LAMBIN
Professeur de Microbiologie
à la Faculté de Pharmacie

à qui je dois la réalisation de ce travail.
En témoignage de ma très respectueuse gra-
titude.

A Monsieur le Professeur G. VALETTE

Professeur de Zoologie
à la Faculté de Pharmacie
Pharmacien des Hôpitaux

A Monsieur A. GERMAN

Chargé des Fonctions de Maître de Conférences
à la Faculté de Pharmacie
Pharmacien des Hôpitaux

qui ont bien voulu faire partie
du jury de cette thèse.

en témoignage de ma profonde
reconnaissance.

INTRODUCTION -

PREMIERE PARTIE

	page
A- <u>MECANISME DE LA PHAGOCYTOSE</u>	5
Fonction phagocytaire	5
I - <u>CHIMIOTACTISME DES LEUCOCYTES</u>	6
1) <u>INFLUENCE DES FACTEURS PHYSIQUES SUR LE TACTISME LEUCOCYTAIRE</u>	6
a) Température	6
b) Pression osmotique	7
2) <u>INFLUENCE DES FACTEURS CHIMIQUES D'ORIGINE TISSULAIRE</u>	7
3) <u>INFLUENCE DES FACTEURS D'ORIGINE HUMORALE</u>	7
a) Complément	7
Essais personnels	8
b) Oxygène	10
c) Ion calcium	10
4) <u>INFLUENCE DES FACTEURS CHIMIQUES D'ORIGINE BACTERIENNE</u>	10
a) Polyosides	11
b) Haptènes polyosidiques	12
c) Antigènes glucido-lipido-protidiques	12
d) Nucleoprotéides	13
e) Toxines	14
II - <u>ACCOLEMENT DES BACTERIES AUX LEUCOCYTES - ENGLOBELEMENT ET DIGESTION</u>	15
III - <u>MOYENS DE DEFENSE DES BACTERIES</u>	17
1) <u>INFLUENCE DE LA CAPSULE SUR LA PHAGOCYTOSE</u>	17
2) <u>INFLUENCE DE LA VIRULENCE SUR LA PHAGOCYTOSE</u>	18
3) <u>INFLUENCE DU TYPE MICROBIEN SUR LA PHAGOCYTOSE</u>	19

	<u>page</u>
IV - <u>SENSIBILISATION DES BACTERIES</u>	20
<u>FACTEURS CAPABLES DE SENSIBILISER LES BACTERIES</u>	21
1) Bactériophages.....	21
2) Tanin, alun et sels divers.....	22
3) Acide ascorbique	22
4) Facteurs divers influençant la phagocytose	23
<u>INFLUENCE DE QUELQUES SUBSTANCES CHIMIOOTHERAPIQUES</u>	25
Action des dérivés sulfamidés.....	26
Action des substances antibiotiques.....	27
 B- <u>TECHNIQUES D'ETUDE DE LA PHAGOCYTOSE</u>	 28

DEUXIEME PARTIE

ESSAIS PERSONNELS

I - ETUDE DE LA PHAGOCYTOSE DES BACTERIES SOUMISES PREALABLEMENT A L'ACTION DES SUBSTANCES INHIBITRICES	31
A - <u>FIXATION DES CONDITIONS EXPERIMENTALES</u>	31
1) <u>RECHERCHE DES DOSES BACTERIOSTATIQUES</u>	31
Détermination de la dose antigénitique.....	32
Technique.....	32
Substances inhibitrices et souches micro- biennes en expérience.....	33
Protocole d'un essai.....	34
Résultats	38
2) <u>METHODE DE DETERMINATION DU NOMBRE DE BACTERIES ET DE LEUCOCYTES MIS EN EXPERIENCE</u>	42
Détermination du nombre de leucocytes dans les exsudats péritonéaux	43
Résultats	44

	<u>page</u>
Détermination de la concentration des suspensions bactériennes	45
Résultats	47
 B - <u>ESSAIS DE PHAGOCYTOSE</u>	 55
1) <u>TECHNIQUE</u>	55
a) Obtention des suspensions microbiennes	55
b) Obtention de leucocytes	56
c) Phagocytose	57
2) <u>DETERMINATION DE L'INDEX PHAGOCYTAIRE</u>	59
Résultats	62
Conclusion	76
3) <u>POURCENTAGE DES LEUCOCYTES DOUES DE POUVOIR PHAGOCYTAIRE</u>	77
Résultats	78
Conclusion	79
 II - INFLUENCE DE L'AGE ET DE LA MORPHOLOGIE DES BACTERIES SUR LA PHAGOCYTOSE	 81
1) <u>INFLUENCE DE L'AGE</u>	81
2) <u>INFLUENCE DES SUBSTANCES INHIBITRICES SUR LA MORPHOLOGIE DES BACTERIES</u>	82
Résultats	84
Conclusion	96
3) <u>INFLUENCE DE LA MORPHOLOGIE DES BACTERIES SUR LA PHAGOCYTOSE</u>	96
 III- INFLUENCE DE L'ION CALCIUM SUR LA PHAGOCYTOSE ET LE TACTISME LEUCOCYTAIRE - VARIATIONS EN FONCTION DE L'ACIDE SALIFIANT LE CALCIUM	 100
Essais personnels	103
Technique	103
Sels de calcium utilisés	104

Résultat des expériences portant sur le tactisme leucocytaire	106
Résultats des expériences portant sur la phagocytose	108
Conclusion	114

CONCLUSION -	115
--------------------	-----

INTRODUCTION

A la suite de ses travaux sur le phénomène de la phagocytose de différentes bactéries, E. METCHNIKOFF (103-104-105-106-107) fonda la théorie cellulaire de l'immunité selon laquelle "les forces microbicides de l'organisme résident dans les phagocytes et non dans les humeurs". Il admettait cependant que des facteurs encore inconnus pouvaient intervenir simultanément pour favoriser le phénomène et, dès 1892, cet auteur (106) montrait qu'après injection de bacilles du Hog-choléra à des lapins "le sérum préservatif exerce chez les lapins non vaccinés une influence stimulante sur les phagocytes".

La théorie de l'immunité cellulaire ne fut pas admise par tous ceux qu'intéressait l'explication du mécanisme de l'immunité ; les travaux de BUCHNER et de PFLEIFFER conduisirent à la théorie humorale de l'immunité selon laquelle la destruction des bactéries est due à une action directe du sérum sans intervention des phagocytes ; ultérieurement, la découverte des antitoxines par BEHRING et KITASATO renforça la thèse de la théorie humorale.

Quelques années plus tard, J. BORDET montra que ces deux théories, loin de s'opposer, se complètent, mais l'on peut souligner, dès à présent, que le rôle essentiel semble bien revenir aux phagocytes ; les facteurs humoraux tels qu'anticorps, complément, ne feraient que favoriser, par un mécanisme que nous analyserons plus loin, l'action destructrice des leucocytes.

Lorsqu'une bactérie réussit à franchir le système défensif superficiel d'un organisme normal, à s'implanter dans les tissus et à s'y multiplier, elle se trouve immédiatement soumise à l'attaque combinée des polynucléaires ayant franchi par diapédèse les parois vasculaires, et des autres cellules macrophagiques issues des tissus. Le sort de ces bactéries dépendra des divers facteurs intervenant successivement dans le phénomène de phagocytose. D'une part, le chimiotactisme plus ou moins prononcé des leucocytes vers le point infecté, leur plus ou moins grande capacité d'englober les bactéries, leur pouvoir de digestion des bactéries phagocytées, d'autre part, les moyens de défense mis en oeuvre par la bactérie attaquée, seront autant de facteurs dont dépendra, finalement, le degré de phagocytose et peut-être la vie de l'organisme.

Les résultats obtenus par la vaccinothérapie, la sérothérapie d'une part, la chimiothérapie d'autre part, sont en accord avec ce que l'on pouvait attendre de la théorie de l'immunité, telle que l'a formulée J. BORDET ; dans les deux premiers cas, les anticorps élaborés par l'organisme ou qui lui sont apportés, sensibilisent les bactéries à l'action des phagocytes ; dans le dernier cas, le produit chimique introduit dans l'organisme arrête la multiplication des bactéries et, de ce fait, facilite la tâche des leucocytes.

Le peu de connaissances que nous avons encore sur le mécanisme d'action des substances chimiques antiseptiques et sur celui des substances dites antibiotiques utilisées en thérapeutique anti-infectieuse, nous a incité à rechercher quelle pouvait être l'action de quelques-unes de ces substances, à l'égard de la réaction normale de phagocytose.

Dans les cas, sans doute très rares, où les bactéries seraient tuées par le produit injecté au malade, les phagocytes n'interviendraient que pour débarrasser l'organisme des corps microbiens morts ; par contre, lorsque les produits injectés n'ont qu'une action bactériostatique plus ou moins poussée sur les bactéries considérées, il apparaît que le rôle de la phagocytose devient primordial.

Dans le cas où les substances antiseptiques ou antibiotiques n'entravent que partiellement le développement des bactéries par le fait d'une concentration insuffisante, leur présence peut modifier cependant les phénomènes vitaux qui régissent le comportement des bactéries ; pour notre part, il nous a semblé intéressant de voir dans quelle mesure des bactéries, soumises à des doses de produits antiseptiques ou antibiotiques inférieures aux doses bactériostatiques, se comportent à l'égard de la phagocytose.

Le plan adopté dans notre travail est le suivant :

Dans une première partie, nous avons rappelé les diverses théories proposées pour comprendre le rôle des différents facteurs entrant en jeu dans le phénomène de phagocytose :

A - Mécanisme de la phagocytose -

- 1 - le chimiotactisme des leucocytes -
- 2 - l'accolement des bactéries aux leucocytes, leur englobement et la digestion intracellulaire -
- 3 - les moyens de défense mis en œuvre par les bactéries -
- 4 - la sensibilisation des bactéries à la phagocytose -

Nous donnons, en outre, les résultats d'essais personnels relatifs à l'action du complément dans le phénomène de Chimiotactisme.

B - Puis, nous examinons de plus près les principales techniques permettant d'étudier ces phénomènes.

Dans une seconde partie, nous avons présenté nos essais personnels:

A - Nous commençons en premier lieu les essais préliminaires destinés à fixer les conditions de nos essais ultérieurs de phagocytose :

- 1 - Détermination des doses bactériostatiques des substances mises

en expérience :

technique,
résultats obtenus.

2 - Méthodes de détermination de la concentration en bactéries et en leucocytes à mettre en oeuvre pour les essais de phagocytose.

B - Nous présentons ensuite les essais relatifs à la phagocytose des bactéries préalablement soumises à l'action de substances antiseptiques ou antibiotiques, dans diverses conditions :

- a) sur des germes utilisés dans des conditions constantes -
- b) en vue de rechercher l'influence de la morphologie des bactéries sur la phagocytose -
- c) en vue de rechercher l'influence de l'âge des bactéries mises en expérience sur la phagocytose -

C - Nous étudions enfin l'influence de l'ion calcium sur la phagocytose et le tactisme leucocytaire, et ses variations en fonction de l'acide salifiant le calcium.

Nous commençons par rendre un hommage ému à Monsieur le Doyen A.SARTORY qui a bien voulu nous faire l'honneur de nous accueillir comme assistant à son laboratoire. Nous garderons de lui le plus fidèle souvenir.

Nous tenons à associer à cet hommage Monsieur J.REGNIER, notre regretté Professeur de Bactériologie dont l'enseignement nous a initié à cette science et ainsi orienté nos études ultérieures.

Nous devons à Mademoiselle S.LAMBIN, Professeur de Microbiologie, d'avoir pu mener à bien notre travail. Elle n'a cessé de nous éclairer de ses conseils et de nous entourer de sa sollicitude. Nous nous faisons un devoir de lui exprimer notre très profonde gratitude et de l'assurer de nos sentiments les plus respectueux.

Monsieur le Professeur G.VALETTE nous a donné des preuves de constante sympathie au cours de nos années d'internat. Qu'il soit assuré ici de notre respectueux et fidèle attachement et vivement remercié d'avoir bien voulu accepter de faire partie du jury de cette thèse.

Il m'est très agréable de remercier Monsieur A.GERMAN, Chargé des

Fonctions de Maître de Conférences, de m'avoir donné un nouveau témoignage d'amitié : il a bien voulu me faire le même honneur.

Monsieur le Docteur A. DELAUNAY, Chef de Laboratoire à l'Institut Pasteur, a bien voulu nous faire l'honneur de nous recevoir à diverses reprises à son laboratoire et de nous éclairer de ses conseils. Qu'il veuille bien accepter l'expression de notre sincère et respectueuse gratitude.

Notre reconnaissance va également à tous nos amis du Laboratoire de Microbiologie dont l'affectueuse sympathie nous a constamment encouragé dans ce travail.

I - CHIMIOTACTISME DES LEUCOCYTES

1) INFLUENCE DES FACTEURS PHYSIQUES SUR LE TACTISME LEUCOCYTAIRE -

Dès les premiers essais de phagocytose, le chimiotactisme des leucocytes a pu être observé à l'égard de différentes substances. Nous rappellerons pour mémoire les essais de J.MASSART (101) et J.JOLLY (75). Plus récemment J.COMANDON (17) a pu présenter de façon spectaculaire le chimiotactisme leucocytaire en utilisant la technique cinématographique; une goutte de suspension leucocytaire étant déposée sur une lame à la surface de laquelle ont été répandus des grains d'amidon, on distingue le mouvement des leucocytes vers les grains d'amidon qui, d'abord sertis d'une ou de plusieurs couronnes de leucocytes, finissent par être ingérés.

W.O.FENN (55) constata également que la très faible solubilité dans l'eau des particules de MnO_2 les rend plus facilement phagocytées que celles de $Mn SiO_3$ dans des conditions identiques d'expérience.

Tout récemment, alliant la cinématographie au microscope à contraste de phase, R.ROBINEAUX et J.FREDERICK ont pu, au laboratoire du Professeur CHEVREMONT, à Liège, réaliser un film, à la projection duquel il nous a été permis d'assister, qui montre très clairement les divers stades du phénomène de phagocytose. L'émission du pseudopode et l'adhésion des leucocytes à la surface de bactériidies charbonneuses sont particulièrement nettes.

Deux facteurs semblent agir directement sur le tactisme leucocytaire.

a) La température.

L'un des premiers, J.C.G.LEDINGHAM (84) montra que lorsque des mélanges de staphylocoques, de sérum et de leucocytes sont exposés à différentes températures, le nombre de bactéries ingérées par leucocyte en un temps donné croît avec les températures entre $18^{\circ}C$ et $37^{\circ}C$, la phagocytose étant 4 à 5 fois plus intense à $37^{\circ}C$ qu'à $18^{\circ}C$.

Selon T.NADSEN et O.WULFF (100), les phagocytes de différentes espèces animales montrent un pouvoir phagocytaire optimum quand ils peuvent exercer leur action à une température identique à celle de l'organisme dont ils sont issus.

Récemment, D.R.HARMON, C.ZARAFONETTIS et P.F. CLARK (62) ont étudié la phagocytose du staphylocoque en présence de sérum homologue par des leucocytes de cobayes, de lapins, de souris, à différentes températures comprises entre $22^{\circ}C$ et $42^{\circ}C$; dans l'ensemble apparut une augmentation de la phagocytose au fur et à mesure que la température s'élevait; cependant si la température dépasse un certain seuil, variable selon les espèces, la phagocytose diminue rapidement; il existe donc pour chaque espèce de leucocytes une température optima.

PREMIERE PARTIE

A - MECANISME DE LA PHAGOCYTOSE

De très nombreux ouvrages ou mémoires ont été consacrés à l'étude du phénomène de la phagocytose. Une bibliographie qui voudrait être complète ne pourrait qu'alourdir un exposé que nous avons désiré aussi simple que possible ; nous ne signalerons que les références les plus récentes et celles qui nous ont paru les plus intéressantes quant à leur rapport avec notre travail.

Nous avons consulté avec beaucoup de profit le bel ouvrage de J.BORDET (12) : "Traité de l'immunité dans les maladies infectieuses", ainsi que celui de A.BOIVIN et A.DELAUNAY (8) intitulé "Phagocytose et infections".

Fonction phagocytaire - La fonction phagocytaire n'est pas l'apanage des leucocytes sanguins ; certaines cellules appelées macrophages, cellules libres du tissu conjonctif, ainsi que certaines cellules fixées du système réticulo endothélial possèdent également ce pouvoir phagocytaire à un degré d'ailleurs supérieur, comme l'ont montré LUCKE B., STRUMIA M., MUDD S., GUTCHEON M., MUDD E. (98^{bis}) et ROBERTSON C. et Van SLANT H. (122) Il est à remarquer que parmi les leucocytes sanguins seuls les grands mononucléaires et les polynucléaires neutrophiles sont doués de pouvoir phagocytaire ; les autres leucocytes sanguins, les lymphocytes en particulier, ne sont capables que d'une phagocytose très faible, souvent nulle

La plupart des auteurs qui ont étudié la physiologie des leucocytes ont effectué leurs expériences sur les polynucléaires, relativement faciles à obtenir, comme nous l'indiquerons ultérieurement. Nous-mêmes, avons également utilisé des exsudats péritonéaux riches en polynucléaires et, dans la suite de cet exposé, le terme de leucocyte sera l'équivalent de celui de polynucléaire neutrophile.

L'acte phagocytaire comporte trois étapes essentielles: le cheminement des leucocytes vers les bactéries, leur accollement au corps microbien et la digestion intracellulaire des bactéries. Nous exposerons successivement les travaux relatifs aux différents facteurs susceptibles d'intervenir dans la détermination de ces phénomènes. Nous indiquerons également les moyens de défense mis en oeuvre par les bactéries ainsi que les différents facteurs susceptibles de favoriser le phénomène de phagocytose.

Si pour certains auteurs l'action de la température sur la phagocytose s'exerce en favorisant l'opsonisation des bactéries, il n'en reste pas moins que la température joue un très grand rôle sur le tactisme leucocytaire et par là même, sur la phagocytose.

b) La pression osmotique.

Egalement très important apparaît le rôle de la pression osmotique ; toute cellule vivante plongée dans un milieu non isotonique voit sa physiologie profondément modifiée ; les solutions hypertoniques ou hypotoniques font disparaître rapidement, chez les leucocytes, l'émission des pseudopodes et suppriment ainsi la motilité de ces cellules ; c'est une des raisons pour lesquelles H.J.HAMBURGER (65) constata une inhibition assez rapide de la phagocytose par les solutions hypertoniques ; dans le cas des solutions hypotoniques, l'inhibition de la phagocytose se révèle moins marquée. A.E.WRIGHT et S.T.REID (146) signalèrent cependant qu'à une solution légèrement hypotonique correspondait une phagocytose maxima du bacille tuberculeux par les leucocytes humains.

2) INFLUENCE DES FACTEURS CHIMIQUES D'ORIGINE TISSULAIRE -

A.DELAUNAY (32) publia en 1941 un mémoire dans lequel il exposait les premiers résultats qu'il avait obtenus à ce sujet ; s'intéressant aux tissus normaux, il chercha à démontrer dans les autolysats de ceux-ci, la présence de facteurs chimiotactiques vis-à-vis des polynucléaires ; après autolyse et centrifugation, le liquide surnageant était injecté dans la peau de cobayes ; après excision des tissus injectés et examen histologique, les résultats se révélèrent négatifs : rein, foie, peau, muscles et rate n'apportaient aucun des facteurs recherchés.

Un seul principe chimiotactique intéressant fut extrait des tissus normaux : le glycogène. A. et M.DELAUNAY et L.NICOL (35) retrouvèrent ce facteur chimiotactique dans le pus, le glycogène étant libéré par la lyse des polynucléaires. Notons ici l'influence très marquée de la perle, produit d'autolyse cellulaire, sur le tactisme leucocytaire.

3) INFLUENCE DES FACTEURS D'ORIGINE HUMORALE -

a) Complément -

Le rôle du complément fut démontré par J.COMANDON (17) et particulièrement étudié par L.SEGUIN (127) et K.WEINBRENNER (141). A.DELAUNAY et J.PAGES (40) reprirent cette étude et constatèrent qu'in vitro le tactisme des polynucléaires ne s'observe que si les cellules se trouvent dans un milieu renfermant une certaine quantité de complément.

L'importance du tactisme est sensiblement proportionnelle à la teneur en complément et l'absence d'un seul des éléments de celui-ci inhibe ce tactisme.

Des cellules mises en suspension dans de l'eau physiologique ou dans un sérum dont le complément a été détruit par vieillissement, par chauffage, par contact avec du venin de cobra ou de l'ammoniaque, ne présentent plus aucun tactisme (39).

Par ailleurs, le complément augmenterait l'intensité du métabolisme respiratoire des phagocytes (37) et jouerait dans la physiologie des leucocytes un rôle important, stimulant toutes les manifestations physiologiques de cette cellule (38).

ESSAIS PERSONNELS -

Nous avons exécuté quelques essais destinés à rechercher le rôle du complément sur le tactisme leucocytaire, en déterminant la quantité minima de complément nécessaire à l'apparition du phénomène ; nous avons utilisé la technique de J.COMANDON (17) :

sur une lamé de verre garnie de grains d'amidon est déposée une goutte de suspension leucocytaire ; une lamelle est posée sur la goutte, lutée et la lame portée à l'étuve à 37°C. ; après un temps déterminé un examen microscopique permet de juger de l'intensité du tactisme leucocytaire.

Préparation des lames -

Une pomme de terre est coupée en menus fragments et broyée au mortier dans un peu d'eau ; cette dernière qui contient les grains d'amidon en suspension est décantée ; par centrifugation, on obtient un culot de grains d'amidon qui est lavé à deux reprises à l'eau distillée ; après la dernière centrifugation les grains d'amidon sont remis en suspension et étalés sur des lames de verre que l'on porte à l'étuve jusqu'à dessiccation.

Cette méthode avait l'inconvénient de fournir des lames sur lesquelles figuraient des grains d'amidon de tailles très différentes ; or, nous avons constaté que les leucocytes étaient plus fortement attirés par les gros grains d'amidon que par les petits ; aussi, avons-nous recherché à uniformiser la dimension des grains d'amidon en laissant reposer l'émulsion quelques instants, en décantant la partie supérieure qui contenait les grains d'amidon de petites dimensions, ce qui nous permettait d'obtenir des lames garnies de grains d'amidon de taille sensiblement égale.

Signalons que ces étalements doivent être préparés extemporanément, ou tout au moins peu de temps avant l'expérience. Avec des lames préparées plus de 48 heures avant l'essai, on constate, tous les autres facteurs étant rigoureusement les mêmes, que le tactisme est plus ou moins diminué ; avec des lames préparées une semaine ou plus avant l'expérience, le tactisme devient irrégulier, faible et parfois insignifiant.

Préparation de l'émulsion leucocytaire -

L'exsudat péritonéal obtenu, comme nous l'indiquerons ultérieurement (page), est centrifugé. Le culot est remis en suspension, après

décantation du liquide surnageant dans un volume équivalent de solution de Ringer ; l'opération est répétée une autre fois ; ces lavages ont pour but d'éliminer le liquide péritonéal dans lequel baignent les leucocytes, liquide contenant normalement une quantité de complément suffisante pour permettre au tactisme leucocytaire de s'exercer.

Obtention du complément -

Une ponction cardiaque est effectuée sur un cobaye ; le sang est recueilli et, après quelques heures, exsude le sérum contenant le complément.

Marche de l'expérience -

Dans une série de tubes à hémolyse sont introduits : le sérum frais de cobaye et la suspension leucocytaire, dans les proportions ci-dessous indiquées :

N° des tubes	1	2	3	4	5
Suspension de leucocytes en eau physiologique	2 cm ³	2 cm ³	2 cm ³	2 cm ³	4 cm ³
Sérum frais de cobayes (en gouttes)	VIII	IV	II	I	I
(Dilution du complément)	I/6	I/10	I/20	I/40	I/80

Une goutte de chaque mélange est prélevée, portée sur une lame garnie de grains d'amidon ; une lamelle est déposée, lutée et la lame portée à l'étuve à 37°C.

L'examen microscopique des lames eut lieu, d'une part après 1/2 heure, d'autre part après 1 heure ; l'examen des lames fait apparaître immédiatement toute l'importance de la dilution du complément ; les grains d'amidon apparaissent plus ou moins sertis de leucocytes et nous indiquons dans le tableau suivant les résultats obtenus.

La notation suivante a été adoptée :

- + + + + + la totalité des leucocytes sertissent les grains d'amidon ;
- + + + + quelques leucocytes sont encore libres ;
- + + + tactisme marqué, les grains d'amidon ne sont pas entourés régulièrement de couronnes de leucocytes ;
- + + quelques leucocytes ont adhéré au grain d'amidon ;
- + tactisme très peu marqué ;
- tactisme nul.

N° des tubes	Dilution du complément	Lecture effectuée après :	
		1/2 h	1 h
I	I/6	++++	+++++
2	I/10	++++	+++++
3	I/20	+++	++++
4	I/40	+	++
5	I/80	-	±

Un tube témoin préparé en utilisant l'exsudat péritonéal tel qu'il est recueilli, a permis de constater un tactisme identique à celui observé dans les tubes I et 2.

De ces résultats retrouvés au cours de plusieurs expériences, il nous a semblé pouvoir conclure que la dilution limite du complément, est la dilution au I/20. Une dilution au I/40 abaisse considérablement l'intensité du tactisme leucocytaire qui disparaît pratiquement avec la dilution au I/80.

Nous avons été heureux de voir, récemment, ce résultat obtenu également par R. ROBINEAUX (123) et publié avant la rédaction de notre travail.

b) Oxygène -

Au cours de la phagocytose, acte qui correspond à une hyperactivité cellulaire, la respiration leucocytaire est plus active ; en l'absence d'oxygène la motilité des leucocytes disparaît et, récemment, J. LEBRUN PAGES et R. ROBINEAUX (82) mirent en évidence le rôle inhibiteur du cyanure de sodium sur le tactisme leucocytaire expliquant ce fait par l'existence d'une relation entre le phénomène du tactisme et les processus oxydatifs.

c) Ion Calcium -

Nous développerons ultérieurement l'influence de l'ion calcium sur le tactisme leucocytaire lorsque nous exposerons les résultats que nous avons obtenus en étudiant comparativement l'influence de l'ion calcium, d'une part sur le tactisme leucocytaire, d'autre part sur la phagocytose.

4) INFLUENCE DES FACTEURS CHIMIQUES D'ORIGINE BACTERIENNE -

Les facteurs étudiés jusqu'ici sont en fait indépendants de la particule phagocytée. Dans le cas le plus intéressant, celui des bactéries, la composition de ces dernières semblait devoir jouer un rôle important ; ceci explique les très nombreuses recherches qui ont été effectuées en vue de mettre en évidence, sur le phénomène du tactisme leucocytaire, le rôle

des principaux constituants bactériens, à savoir : les polysides, les haptènes polysidiques, les anti-toxines glucido-lipido-protidiques, les nucléoprotéides, les toxines.

a) Polysides -

M.DIXON et Mc CUTCHEON (48) avaient déjà démontré in vitro le chimiotropisme positif de Staphylococcus albus sur les leucocytes ; A.DELAUNAY effectua une série de recherches dans le but d'identifier les principes chimiotactiques présents dans les bactéries.

Opérant sur une souche de staphylocoques non pathogènes afin d'éviter certaines réactions propres à l'exotoxine spécifique qui pourrait gêner l'appel des leucocytes et entraver la phagocytose des cocci, A. DELAUNAY et R.SARCIRON (41) obtinrent les résultats suivants : les extraits de staphylocoques obtenus, soit par la méthode des autolysats, soit par la méthode mise au point par A.BOIVIN pour l'obtention des antigènes glucido-lipido-protidiques, sont doués d'un pouvoir chimiotactique vis-à-vis des polynucléaires ; mis au contact d'un sérum antistaphylococcique (antibactérien), ils provoquent l'apparition d'une nette précipitation ; après chauffage pendant 1/2 heure à 100°C, ils gardent leur pouvoir d'attirer les leucocytes.

Les constituants polysidiques spécifiques de ces bactéries constitueraient dans ce cas le facteur chimiotactique.

Les travaux de J.COMANDON (17), de Mc CUTCHEON (19) et de CHAMBERS et GRAND (16) avaient déjà souligné l'action chimiotactique de divers polysides. A.DELAUNAY (24) observa qu'in vivo les polysides suivants : amidon soluble, glycogène, gomme arabique, inuline et les glycoprotéines suivantes : mucine gastrique, humeur vitrée apparaissent très chimiotactiques, provoquant un appel précoc des polynucléaires, 3 heures après l'injection.

Des expériences effectuées in vitro en mettant en présence des leucocytes et ces substances confirmèrent les propriétés chimiotactiques de ces dernières : A.DELAUNAY et R.SARCIRON (42).

S.MIELNIK - KOSMIDERSKI (108), après étude de l'action des polysides extraits des bactéries du rhinosclérome démontra que ceux-ci favorisent la phagocytose des bactéries non capsulées par les leucocytes humains ; à haute dose le polyside est nettement l'avisant, mais à dose faible, il abaisse l'index phagocytaire ; cette action serait spécifique.

Des essais effectués sur plusieurs monoosides : arabinose, galactose, glucose, mannose, fructose, sur un sucre aminé, le glucosamine et sur quelques diosides : saccharose, lactose, maltose, démontrèrent que tous ces sucres possèdent une influence chimiotactique cependant moins nette que celle des polysides, tant au point de vue de l'intensité qu'au point de vue de la régularité de la réaction.

Des injections par voie intra-veineuse de dextrose amenèrent R.FUNNICLIFF (138) à constater l'augmentation de l'index phagocytaire du

sang de lapin vis-à-vis du streptocoque hémolytique.

b) Haptènes polyosidiques -

L'influence de ces substances sur le tactisme leucocytaire fut soulignée par A.DELAUNAY (31) et ses collaborateurs (A.DELAUNAY, R.SARCIRON et Y.LEHOULT) (43).

L'haptène glucidique de plusieurs bactéries à réaction Gram négative, tels le bacille typhique, le paratyphique B, le colibacille, les bacilles de Flexner et de Shiga, produit dépourvu de toxicité, provoque chez l'animal, injecté dans la peau à la dose de un milligramme, un très fort afflux de globules blancs.

Si la dose injectée diminue, le pouvoir chimiotactique décroît pour disparaître à la dose de 1/100 de milligramme ; au point de vue quantitatif, ce pouvoir chimiotactique est voisin de celui du polyoside staphylococcique et nettement supérieur à celui du glycogène pour lequel une dose de 1/10 de milligramme ne permet pas d'observer le phénomène du tactisme leucocytaire.

c) Antigènes glucido-lipido-protidiques-

L'injection d'une forte dose d'antigène glucido-lipido-protidique tue l'animal sans apparition d'aucune réaction locale ; A.DELAUNAY (31) constata, après dosage de la quantité injectée, qu'une dose de un milligramme injectée dans le derme, ne provoquait aucun appel leucocytaire, tandis que des doses inférieures 1/10, 1/100, 1/1.000 de milligramme entraînaient un afflux croissant de leucocytes, l'afflux maximum correspondant à la dose de 1/1.000 de milligramme ; ceci est vrai quand il s'agit d'animaux neufs.

Au contraire, chez l'animal immunisé les résultats sont différents : ce sont les fortes doses qui produisent un effet chimiotactique ; l'effet inhibiteur des fortes doses d'antigène glucido-lipido-protidique est, dans le cas d'animaux immunisés, annihilé et c'est au milligramme que la réaction est la plus forte : la toxicité de l'antigène explique ce phénomène (34).

Des conclusions identiques furent formulées par E.LASFARGUES et A.DELAUNAY (80), après étude du pouvoir chimiotactique d'une endotoxine bactérienne observé en culture de tissus.

L'antigène du bacille pyocyanique peu toxique pour le cobaye, provoque à la dose de un milligramme en injection intradermique chez un animal neuf, un très fort appel leucocytaire (A.DELAUNAY et Y.LEHOULT) (33).

Les endotoxines glucido-lipido-protidiques identifiées aux antigènes somatiques O exercent ainsi une action empêchante sur l'afflux des leucocytes au niveau des tissus contaminés (43) ; elles favorisent le développement des processus infectieux et jouent ainsi ce que A.BOIVIN et A.DELAUNAY (9) ont appelé le rôle d' "agressines" ; il en résulte que l'anticorps correspondant, anticorps O, exerce un pouvoir anti-infectieux, non seulement en neutralisant l'action de la toxine, y compris son action sur

le tactisme, mais encore en sensibilisant spécifiquement les corps microbiens à la phagocytose.

A. BOIVIN, A. DELAUNAY (10) firent à ce sujet une série de recherches qui permirent de démontrer l'action nocive des antigènes glucido-lipido-protidiques se manifestant par une leucopénie, de la congestion des plaques de Peyer et, éventuellement, l'avortement des animaux.

Chez l'animal neuf, ces substances paralysent la défense phagocytaire sans toucher au leucocyte lui-même, en lui conservant son pouvoir phagocytaire, A. DELAUNAY (30).

En effet, l'adjonction d'une solution concentrée d'antigène glucido-lipido-protidique à un mélange leucocytes-microbes, n'empêche pas la phagocytose.

In vivo cet antigène peut donc jouer un rôle d'agressine non spécifique.

Chez l'animal immunisé, ces substances peuvent jouer un rôle agressif spécifique ; l'animal immunisé possède dans son sérum l'anticorps correspondant ; l'injection de l'antigène neutralise l'anticorps, supprimant ainsi l'un des principaux agents de défense, et rend à l'organisme immunisé l'état d'un organisme neuf.

Si les propriétés phagocytaires des leucocytes ne sont pas altérées par l'antigène glucido-lipido-protidique, il en est de même de celles des cellules du système réticulo-endothélial, comme l'ont montré encore A. DELAUNAY, R. SARCIRON et J. PAGES (44) ; il semble de plus en plus certain que l'action pro-infectieuse de ces antigènes est due surtout au fait qu'ils empêchent la diapédèse des polynucléaires, en s'opposant à la marche des globules blancs, en modifiant vraisemblablement la physiologie des cellules endothéliales des capillaires, comme l'ont indiqué A. et M. DELAUNAY et J. PAGES (36).

Les antigènes glucido-lipido-protidiques possèderaient aussi, d'après A. DELAUNAY (28-29) un pouvoir leucopénisant qui expliquerait, en partie, la leucopénie marquée, observée au cours de la fièvre typhoïde ; leur injection au cobaye à doses inframortelles produit une leucopénie très marquée qui disparaît après 24 heures ; cette leucopénie pourrait expliquer partiellement, l'absence de réaction leucocytaire au point d'injection.

d) Nucléoprotéides -

Les nucléoprotéides bactériens ainsi que leurs produits de dégradation attirent les globules blancs ; ce phénomène est plus marqué cependant lorsque l'on utilise le complexe nucléoprotéidique complet.

Leur chimiotactisme maximum correspond aux doses comprises entre 1/100 et 1/1000 de mg ; à doses égales ces nucléoprotéides possèdent un chimiotactisme inférieur à celui des polyosides. A. DELAUNAY et R. VENDRELY (46). A. DELAUNAY, R. SARCIRON, R. VENDRELY et Y. LEHOULT (45).

e) Toxines -

Cette inhibition du tactisme leucocytaire est-elle due uniquement à l'action des antigènes précédemment étudiés, ou peut-elle également apparaître sous l'influence de différentes toxines ? Pour répondre à cette question, A. DELAUNAY entreprit l'étude de l'action exercée par différentes toxines sur le tactisme leucocytaire.

Il put constater (26) que l'exotoxine staphylococcique était douée d'une action nocive sur les globules blancs, action remarquée depuis très longtemps (leucocidine de Denys et Van de Velde en 1895), et plus récemment par R.M. PIKE (118) qui constata qu'une culture de staphylocoques sur gélose, émulsionnée dans de l'eau physiologique, filtrée, donne un filtrat qui possède la propriété d'inhiber la phagocytose du staphylocoque par les leucocytes du sang normal ; il observa que cette action n'était pas empêchée par les anticorps spécifiques.

L'injection de cette toxine entrave l'afflux des globules blancs pendant quelques heures, mais après 24 heures, l'afflux de ceux-ci est massif ; chez l'animal immunisé par l'anatoxine, l'appel leucocytaire est comparable, quant à son intensité et à sa précocité, à celui provoqué par le bouillon seul. L'anatoxine spécifique facilite la lutte anti-microbienne par le fait qu'en neutralisant la toxine, elle permet aux globules blancs, destructeurs des bactéries, l'accès au foyer infectieux.

A. DELAUNAY (25) expérimenta ensuite l'action de différentes toxines, très éloignées des antigènes par leur nature chimique et leurs propriétés biologiques : toxine du bacille tétanique, du bacille diphtérique, du bacille de Preisz-Nocard. L'inoculation au cobaye de ces toxines provoque une inhibition du tactisme leucocytaire qui diffère de celle provoquée par l'injection des antigènes glucido-lipidiques par les points suivants : cette inhibition est très tardive et souvent partielle, tandis que les antigènes glucido-lipido-protidiques provoquent une inhibition complète et précoce.

P. RITOSSA (120) constata que la phagocytose des bacilles diphtériques est entravée par la présence de leur toxine ; l'adjonction de sérum anti-diphtérique supprime l'action nocive de la toxine.

Inversement, la présence de la toxine favorise parfois la phagocytose des bactéries ; c'est ce qu'ont montré pour le gonocoque J. WITTENBERG, M. LEDERER et M. MOLLOV (143) ; la gonotoxine, dans ce cas, favorise beaucoup l'action des leucocytes sur les bactéries.

En fait, il n'y a pas, à proprement parler, phagocytose, les bactéries n'étant pas détruites.

L'influence de la tuberculine sur la phagocytose fut étudiée en particulier sur deux germes : le staphylocoque et le bacille tuberculeux par H. CORPER, M. COHN et R. STONER (18) ; chez les cobayes normaux, la phagocytose est à peine diminuée par la tuberculine. S'il s'agit de cobayes tuberculeux ou de cobayes présentant des phénomènes d'allergie ou de cobayes tuberculo-anaphylactiques, on constate une diminution très sensible de la phagocytose ; la toxicité plus grande de la tuberculine pour les

animaux sensibilisés pourrait expliquer cet abaissement de la phagocytose.

Il est à remarquer que la phagocytose des bacilles tuberculeux par les leucocytes de cobayes tuberculeux ou sensibilisés est identique à celle obtenue avec des leucocytes de cobayes normaux.

Résistance des globules blancs aux toxines -

Un nombre restreint de travaux ont été effectués sur ce sujet. T. RITOSSA (120), après avoir observé que les leucocytes humains atténuent les doses faibles de toxine diphtérique, en concluait que, dans l'organisme, une partie de la toxine est fixée par les leucocytes.

Ce même auteur, en collaboration avec I. HIRSH (121), avait supposé, en conclusion d'expériences antérieures, que l'atténuation de la toxine diphtérique par les leucocytes était due aux ferments leucocytaires susceptibles de dénaturer la toxine.

L'absorption ou l'adsorption de la toxine tétanique ou de l'endotoxine typhique par les leucocytes a été également observée par A. DELAUNAY (22) qui souligne que ce phénomène est dans tous les cas très peu marqué.

II - ACCROLEMENT DES BACTERIES AUX LEUCOCYTES - ENGLOBEMENT ET DIGESTION

La condition indispensable à réaliser pour que se produise le phénomène de phagocytose est qu'un contact puisse intervenir entre la cellule et la particule.

L'influence de la probabilité de contact entre phagocytes et particules sur le degré de phagocytose, a été étudié par W.O. FENN (53) qui montra que l'intensité du phénomène phagocytaire est parallèle aux probabilités des rencontres. Cet auteur trouva une relation qui, tenant compte de la taille des cellules et des particules, se révéla vérifiée par l'expérience.

W.O. FENN établit également que la probabilité des rencontres dépendait de la vitesse relative des cellules et des particules ; en faisant varier les vitesses, il montra que la phagocytose est d'autant plus forte que les rencontres sont plus nombreuses. J. BORDET (12) cependant considère que, dans le cas de bactéries douées d'une très grande mobilité, telle le vibron cholérique, la vitesse de déplacement de la bactérie diminue le phénomène de phagocytose.

Pour ses expériences, W.O. FENN utilisait la méthode "film", méthode consistant à examiner entre lame et lamelle une goutte du mélange phagocytes-bactéries. Avec cette technique le mouvement dû à la gravité n'intervient pas et, seul, entre en jeu le mouvement amiboïde de la cellule qui rampe vers la particule, vient en contact avec elle, puis l'englobe ou non.

Sous l'effet d'un chimiotactisme positif, phagocytes et bactéries arrivent au contact ; se produit alors la seconde phase de la phagocytose, la phase d'accrolement qui va précéder la phase d'englobement.

Cette phase d'accrolement fut signalée et étudiée par différents auteurs : C.LEVADITI (24), W.BARIKINE (3), C.LEVADITI et S.MUTERMILCH (91) et M.LE FEVRE de ARRIC (85-86).

Les variations de tension superficielle et de potentiel électrique sont des facteurs qui, selon ABRAMSON (1) et WEDEEN (140) expliquent les migrations leucocytaires et interviennent au moment de la phase d'accrolement ; selon S.MUDD (110), le potentiel isoélectriques des bactéries varie considérablement selon l'espèce bactérienne en fonction de la composition chimique des microbes (hydrates de carbone de la capsule des pneumocoques virulents, lipoides des bactéries acido-alcool résistants). Ainsi, le potentiel isoélectrique du pneumocoque est au pH 6.6, celui du staphylocoque au pH 2, celui du bacille de Flexner au pH 4.

Cependant, A.BOIVIN et A.DELAUNAY (8) considèrent qu'une certaine viscosité de la surface cellulaire a plus d'importance que ne peuvent en avoir les charges électriques portées par les cellules et les bactéries.

On peut souligner à ce sujet diverses expériences de P.LECONTE DU NOUY (83), selon lesquelles, l'adjonction d'un antigène à un sérum d'animal immunisé contre cet antigène, double la viscosité de ce dernier pendant quelques minutes ; seul le mélange spécifique permet de constater le phénomène. Notons que cette augmentation de la viscosité est mise à profit pour mettre en évidence les anticorps spécifiques.

Le même auteur montra que l'injection d'un antigène à des lapins provoquait l'abaissement progressif de la tension superficielle finale du sérum des animaux ; les autres propriétés physiques du sérum n'étaient pas modifiées ; la différence entre la tension superficielle initiale et la tension superficielle finale du sérum est la seule variation physique apparente accompagnant l'immunité.

Dès que la bactérie est venue au contact du leucocyte, celui-ci l'englobe rapidement, son protoplasme semblant glisser le long du corps bactérien. Les bactéries incluses dans le protoplasme sont alors attaquées par les enzymes contenus dans le protoplasme leucocytaire. Ces enzymes se sont révélés de nature très variée : glucidolytiques, protidolytiques, lipidolytiques.

E.L.OPIE (116 bis) et D.GROB (61 bis) étudièrent en particulier les enzymes protéolytiques dont le rôle paraît primordial. Il existerait diverses protéinases : l'une localisée dans les polynucléaires agit en milieu légèrement alcalin ; l'autre localisée dans les mononucléaires agit au contraire en milieu légèrement acide. Ce sont ces enzymes qui dans les foyers de suppuration provoquent, après leur mise en liberté consécutive à la lyse des leucocytes, la destruction des tissus morts.

Une lipase leucocytaire fut également mise en évidence par W.FLEISCHMANN (57 bis) et, plus récemment, W.F.HAIGHT et R.J.ROSSITER (64 bis) montrèrent la présence dans les leucocytes de deux phosphatases, l'une acide localisée dans les lymphocytes, l'autre alcaline localisée dans les polynucléaires. La présence d'estérases fut également démontrée par E.WONG (143 bis).

Ces enzymes si divers permettent la désintégration des différentes espèces bactériennes et après un laps de temps assez court la plupart des bactéries disparaissent du protoplasme leucocytaire.

Cependant dans certains cas exceptionnels les bactéries ne sont pas détruites par les enzymes leucocytaires : tel est le cas du bacille tuberculeux ou du gonocoque. Non seulement ce dernier n'est pas attaqué par les enzymes leucocytaires mais il peut encore se reproduire à l'intérieur des leucocytes.

En général la digestion des bactéries achève l'oeuvre des phagocytes qui parviennent ainsi à débarrasser, de façon définitive, l'organisme des bactéries qui avaient pu en franchir les défenses superficielles.

III - MOYENS DE DEFENSE DES BACTERIES

Nous n'avons jusqu'ici considéré les bactéries que d'un point de vue très général ; or, les expériences montrent que la phagocytose dépend, dans une large mesure, de certains facteurs propres à celles-ci : la présence d'une capsule, la virulence, le type de la souche bactérienne, seront des éléments susceptibles de modifier beaucoup l'intensité de la phagocytose vis-à-vis d'une bactérie déterminée.

1) INFLUENCE DE LA CAPSULE SUR LA PHAGOCYTOSE -

La présence de la capsule, chez les bactéries, est considérée comme constituant un facteur de défense important contre la phagocytose.

S.MIELNIK - KOSMIDERSKI (108) attribuait à la présence de la capsule dans les jeunes cultures du bacille du rhinosclérome, l'action inhibitrice sur la phagocytose.

J.DUBOS (49) rappelait que si la présence d'une véritable capsule n'est pas indispensable pour rendre les bactéries^{non} phagocytées, il n'en reste pas moins que les bactéries encapsulées, telles que le streptocoque dans les cultures jeunes, le pneumocoque, résistent à la phagocytose. Selon cet auteur, le rôle de la capsule ne pourrait être assimilé à celui d'une simple barrière. Ses constituants chimiques possèderaient une acti-

tivité antiphagocytaire très marqué. Cette théorie est étayée par les expériences de R.H.P. SIA (129), qui, en ajoutant à un mélange de leucocytes et de pneumocoques non capsulés, normalement très rapidement phagocytés, une solution purifiée de polysides capsulaires, observa l'inhibition de la phagocytose de ces pneumocoques.

L'injection d'antigènes capsulaires donne naissance à des anticorps qui permettront aux leucocytes de phagocyter les bactéries capsulées possédant ces antigènes. C'est ce que montra D.BOARI (7) en vaccinant des lapins à l'aide de bactériidies charbonneuses encapsulées, d'une part, non encapsulées, d'autre part ; il constate que les leucocytes des lapins immunisés à l'aide des bactériidies encapsulées, phagocytèrent les bactériidies encapsulées ou non à un degré beaucoup plus élevé que les leucocytes de lapins non immunisés. Il remarqua que parfois le contact des leucocytes avec les bactériidies n'aboutissait pas à la phagocytose, mais seulement à la dissolution de la capsule.

Quant aux leucocytes des lapins vaccinés avec des bactériidies non encapsulées, ils phagocytèrent bien les bactériidies non encapsulées, mais très faiblement les autres.

Tout récemment C.LEVADITI et J.VAILLET (97), en conclusion d'une étude sur le mode d'action in vivo de la streptomycine, rappelaient que c'est en s'opposant à la formation de cet appareil de protection antiphagocytaire qu'est la capsule, que ce médicament rendait les microorganismes aptes à être détruits.

2) INFLUENCE DE LA VIRULENCE SUR LA PHAGOCYTOSE -

Les premiers essais concernant l'influence de la virulence sur la phagocytose conduisirent les auteurs à des conclusions dissemblables ; d'après L.SEGUIN (127) "les bactéries avirulentes sont toutes facilement phagocytées, tandis que les bactéries virulentes le sont peu ou pas du tout" ; il lui apparut qu'à mesure que la virulence augmente la phagocytabilité in vitro diminue, mais non pas proportionnellement à l'augmentation de la virulence ; cette règle n'est pas cependant absolue ; le bacille tuberculeux et le gonocoque virulents sont très facilement englobés et les rapports entre virulence et phagocytabilité sont trop incertains pour que l'on puisse conclure du degré de virulence d'une bactérie d'après sa phagocytabilité.

De même F.PRIESTLEY (119) montre qu'il est pratiquement impossible d'affirmer la sensibilité ou la résistance d'un bovin à Brucella abortus en se basant uniquement sur l'épreuve opsono-cytophagique ; la sensibilité ou la résistance des animaux ne modifie pas la phagocytose qui a la même intensité dans les deux cas.

K.WEINBRENNER (141) trouva que les staphylocoques jaunes virulents sont phagocytés plus faiblement que les staphylocoques blancs saprophytes ; par contre, il ne trouva aucune différence entre le pouvoir pathogène et la phagocytabilité de différentes souches de bacilles paratyphiques.

W.W.SPINK (131) étudiant le phénomène de phagocytose au cours d'une infection staphylococcique, constata qu'il n'y a pas de différence notable, qu'il s'agisse de bactéries pathogènes ou non.

A.PETERSSON (117) déclara que les leucocytes de lapin ou ceux de souris sont capables de tuer in vitro des bactériidies charbonneuses virulentes ; de même, d'après cet auteur, les leucocytes de lapin ou de cobaye sont susceptibles de détruire les staphylocoques très virulents.

W.ROLLATH et F.RAABE (77) expérimentant sur des streptocoques virulents et avirulents, constatèrent, au contraire, que si un rempart leucocytaire peut se former quand il s'agit de streptocoques non virulents, il n'en est plus de même avec les streptocoques virulents. La présence de la capsule explique vraisemblablement le phénomène.

Selon J.ORA EWING (52) les bactéries diphtériques du type gravis sont plus résistantes à la phagocytose que celles du type mitis et cette différence expliquerait la plus grande gravité des affections provoquées par le type gravis.

En conclusion de travaux sur Shorthella typhosa, L.ALMON (2) et S.S.EMERY (5) montrèrent que les souches de cette bactérie possédant l'antigène de virulence Vi possédaient une résistance particulière à la phagocytose.

En fait on ignore encore pour quelle raison une bactérie se montre virulente ; cette virulence ne peut s'expliquer uniquement par la présence de tel ou tel antigène ; elle serait selon A.DELAUNAY "sous la dépendance de la capacité offensive et défensive de l'individu bactérien considéré en tant qu'unité d'une part, du pouvoir de multiplication de ce germe d'autre part".

Le pouvoir de multiplication très différent selon l'endroit de l'organisme où ils sont introduits, explique l'importance capitale que possède la voie de pénétration des bactéries.

3) INFLUENCE DU TYPE MICROBIEN SUR LA PHAGOCYTOSE -

Depuis la différenciation des types R et S et la connaissance de leur structure antigénique, de nombreux auteurs ont étudié la phagocytose comparée des deux types.

K.WEINBRENNER (141) considérait que l'influence des types R ou S était sans effet sur la phagocytose ; par contre, A.DELAUNAY (23), opérant sur des souches S et R de bacilles typhiques, paratyphiques B et de bacilles de Shiga, formula les conclusions suivantes :

In vitro les formes S (Smooth) recouvertes d'une pellicule d'antigène glucido-lipido-protidique O sont beaucoup moins phagocytées que les formes R (Rough), formes dépourvues d'antigène O.

In vivo les résultats apparaissent différents. La virulence de la bactérie qui n'est pas fatalement liée à la présence d'antigène O, prendra le pas sur la constitution antigénique ; c'est ainsi, que l'introduction, dans la cavité péritonéale d'un cobaye, de bacilles de Shiga peu virulents de type S et de bacilles typhiques virulents également de type S, est suivie dans le premier cas d'une phagocytose très marquée, qui assure l'élimination des bactéries, tandis que dans le second cas, la difficulté que montrent les leucocytes à englober les bacilles typhiques ainsi que la très rapide prolifération de ces derniers amènent rapidement la mort du cobaye auquel ils ont été injectés.

Dans le cas où les phagocytes sont en lutte avec des germes avirulents du type R, ou avec des bactéries peu virulentes du type S, ils peuvent parvenir seuls à les éliminer ; par contre, en présence de bactéries virulentes du type S, les phagocytes deviennent incapables à eux seuls d'assurer la défense victorieuse de l'organisme.

IV - "SENSIBILISATION DES BACTERIES -

Dès 1890, E.METCHNIKOFF (104) écrivait "on m'a souvent attribué la pensée qu'en mettant en évidence le phagocytisme, je niais toute autre influence servant à débarrasser l'organisme des microbes envahisseurs. Je me suis toujours défendu contre cette assertion et répète encore une fois que le rôle des phagocytes est très important dans les maladies infectieuses mais que cela ne prouve nullement qu'on ne trouvera pas un jour, aidant l'action des phagocytes, une autre influence qui échappe encore à nos investigations".

Avant que ne fut mis en évidence par A.DELAUNAY (21) le rôle prépondérant de l'anticorps O, S.MUDD, B.LUCKE et M.STRUMIA (112) avaient étudié l'action de la sensibilisation des bacilles typhiques avec les antigènes ciliaires et somatiques sous le rapport de la phagocytose et étaient arrivés à la conclusion que si l'anticorps H favorise la phagocytose des bactéries ciliées uniquement, l'anticorps O, par contre, favorise la phagocytose des bactéries ciliées ou non.

A. WRIGHT (144) considérait que la vaccination exerce sur le pouvoir phagocytaire des cellules une double action spécifique et non spécifique.

Aujourd'hui, l'action sensibilisante indispensable de l'anticorps O a été démontrée par A.DELAUNAY (21), qui put réaliser à l'aide d'immun sérum la phagocytose totale de bactéries virulentes du type S.

Nous avons vu précédemment que certains auteurs attribuaient au

point isoélectrique une certaine influence sur la phagocytose ; or, après traitement par un sérum normal, tous les microbes atteignent à peu près le même point isoélectrique dans la zone de pH comprise entre 4.75 et 5.5.

Après sensibilisation par le sérum immunisant homologe, leur potentiel isoélectrique se trouve dans la zone de pH comprise entre 4.2 et 5.5.

Il semble que les protéines du sérum, en se précipitant légèrement à la surface des bactéries, sensibilisent les microbes et les rendent plus accessibles à l'action de la phagocytose ; de même W.C.FEIN (55) expliquait, par le pouvoir différent que possèdent le carbone et le quartz d'absorber les substances sériques, la différence observée sur le degré du phénomène de phagocytose de ces différentes particules par les leucocytes ; cette sensibilisation des bactéries par le sérum immunisant se conserve à des dilutions très élevées.

L'adsorption des protéines sériques par les particules qui varie selon la valeur du pH explique, selon W.O.FEIN (54) l'influence que possède ce facteur sur la phagocytose ; H.J.HAMBURGER (55) avait déjà souligné que l'intensité du phénomène phagocytaire était maxima dans un milieu présentant une réaction neutre, l'addition de soude ou d'acide chlorhydrique diminuant nettement l'intensité du phénomène.

Cette explication de l'influence du pH est plausible, quoique l'influence directe de la valeur de ce facteur sur la physiologie générale des phagocytes ou des bactéries nous apparaisse plus important.

Si l'influence des composants opsonisants du sérum apparaît primordiale, différents facteurs semblent intervenir également pour favoriser l'action des phagocytes.

FACTEURS CAPABLES DE SENSIBILISER LES BACTERIES -

1) Bactériophages -

Ce fut F. d'HERELLE (71) qui, le premier, montra les propriétés que possédaient les bactériophages de favoriser la phagocytose en soulignant que les bactériophages n'augmentent que la phagocytose des bactéries susceptibles de lyse ; de ce fait, les phénomènes de lyse et d'opsonisation présenteraient entre eux un certain parallélisme.

A.R.NELSON (114) démontra les propriétés précédentes en utilisant des leucocytes de lapin et une race de staphylocoques sensibles au phage employé ; les staphylocoques et les leucocytes de lapin étant seuls en présence, l'index phagocytaire est de 0.3. Après adjonction du bactériophage, l'index s'élève à 2.7. Avec une race résistante de staphylocoques, les chiffres trouvés sont respectivement de 0.4 et 0.7.

G.H.SMITH (130) tenta de démontrer comment s'expliquait la préparation des bactéries à la phagocytose par les phages ; de ses expériences, l'auteur conclut que le phage, par adsorption par les bactéries, amène en

elles des changements qui les rendent de plus en plus facilement phagocytaires.

D'après les expériences de A.R.NELSON (114), il semble que les phages agissent également directement sur les leucocytes ; A.R.NELSON injecta par voie intra-veineuse à des lapins, des phages de staphylocoques, et expérimenta sur les leucocytes de ces lapins, prélevés à des intervalles de temps réguliers après l'injection : avec une souche sensible de staphylocoques, l'index opsonique passe de 1.1 à 6.7 en 2 heures ; avec une souche résistante, la variation de l'index opsonique est beaucoup plus faible, cet index passant de 1.3 à 1.7.

R.BRUYNOGHE et J.MAISIN (14) confirmèrent l'action directe des bactériophages sur les leucocytes en constatant que l'addition de leucocytes à une suspension de bactériophages a pour effet de diminuer très rapidement la concentration de ces derniers : y a-t-il perméabilité de la cellule au phage ou adsorption à la surface de la cellule ? La question n'est pas encore résolue.

F.HODER (73) reprit ultérieurement cette question et expérimenta avec des souches de staphylocoque jaune, de bacille typhique, de bacille dysentérique et de colibacille ; il constata que le bactériophage transforme un certain nombre de bactéries sensibles en colonies secondaires qui se montrent moins résistantes à l'action phagocytaire des leucocytes que la souche originelle.

Tous les travaux effectués sur cette question confirment donc l'action favorisante des bactériophages sur le phénomène de la phagocytose ; cette action s'ajoute ainsi dans la défense de l'organisme ou pouvoir lytique exercée par les bactériophages.

2) Tanin, alun et sels divers -

F.NEUFELD, R.ETINGER-TULEZYNSKA (116) constatèrent que le traitement au tanin à 1/5.000 à 37°C pendant 1/2 heure rendait fortement phagocytaires une souche très virulente de pneumocoques pour laquelle la phagocytose spontanée était nulle ; des expériences réalisées in vitro montrèrent que la solution de tanin n'a aucune action nocive sur le pneumocoque.

Des résultats identiques furent obtenus avec l'alun qui permet d'obtenir la phagocytose de pneumocoques virulents des types I et III, mais sans cependant permettre la phagocytose de toutes les bactéries.

D'autres substances telles les sulfate, nitrate et chlorure d'aluminium, certains sels à cation tétra ou trivalent et certains sels de plomb ++ permettent d'obtenir des résultats identiques, mais en général moins favorables.

3) Acide ascorbique -

Ce sont en particulier des auteurs italiens qui ont étudié

l'action de l'acide ascorbique sur la phagocytose.

L.MESSINA et G.VERGA (102), après injection d'acide ascorbique pendant plusieurs jours consécutifs à des lapins, étudièrent la valeur de la phagocytose et du titre opsonique obtenus avec le sang des lapins traités et avec celui des lapins non traités ; il apparaît que l'acide ascorbique n'influence pas directement l'activité phagocytaire des leucocytes mais exalte le pouvoir opsonisant du plasma sanguin.

A.MACCARI (113) arriva à des conclusions identiques, notant une augmentation très nette du titre opsonique du sérum ainsi qu'une augmentation du nombre des globules blancs qui passe en moyenne de 6.400 à 10.000.

4) Autres facteurs influençant la phagocytose -

Dans la dernière partie de cet exposé général sur le mécanisme de la phagocytose nous indiquerons l'influence de divers facteurs dont le rôle n'est pas encore parfaitement élucidé.

Les expériences effectuées pour déterminer leur influence sur la phagocytose n'ont que rarement abouti à des résultats superposables ; d'autre part, les auteurs interprètent souvent leur action de façon très différente.

Dans leur mémoire S.WUDD, M.M.CUTCHEON et B.LUCKE (111) ont donné une abondante bibliographie sur cette question.

Plus récemment, J.GLENN (61) observa que les leucocytes fournis par des animaux normaux soumis à l'action des rayons X, appliqués sur une petite zone cutanée pendant 48 ou 96 heures, manifestent un pouvoir phagocytaire accru ; J.GLENN émit les suppositions suivantes pour expliquer le phénomène :

action directe des rayons sur les cellules,
libération de substances opsonisantes,
libération d'anticorps véritables,
libération de certains principes bactéricides.

Y.ISCHIMOTO (74), étudiant l'influence des lipides sur la phagocytose, constata que l'injection à l'animal de bactéries traitées à l'éther, était suivie d'une phagocytose inférieure à celle constatée après une injection de bactéries témoins, non traitées à l'éther, et montra que l'addition de lipoides homologues ou hétérologues augmente de manière considérable l'intensité de la phagocytose des microbes introduits dans la circulation.

F.TALLO et G.PARRINO (133), opérant simultanément in vitro et in vivo à l'aide d'émulsions de bacille typhique additionnées ou non des substances lipoidiques à observer, constatèrent que :

- l'administration de graisses neutres, de lipoides et de protéines du sang influence favorablement la phagocytose,

- tandis que la cholestérine exerce plutôt une influence inhibitrice.

Des expériences réalisées in vitro conduisirent aux mêmes conclusions.

N.FETHKE (56), après avoir montré l'importance de l'action exercée par certains acides gras libres du bacille tuberculeux sur la phagocytose de cette bactérie, a cherché à connaître le rôle que jouent sur la phagocytose les sels d'acides gras saturés normaux de la série homologue jusqu'en C 18 ; l'auteur reprit la technique de H.J.HAMBURGER et utilisa des leucocytes de cheval, de l'amidon de riz et des solutions de savon isotoniques, tamponnées, contenant un peu de sérum frais de cheval.

L'activité phagocytaire n'est pas influencée par les homologues inférieurs, augmentée du caproate au caprate ; à partir de l'undecylate, la toxicité des savons à longues chaînes provoque une inhibition complète de la phagocytose. L'augmentation de la phagocytose serait due à la diminution de la tension superficielle provoquée par les sels d'acides gras de C 6 à C 10.

A partir des savons en C 11 l'auteur admet la théorie de LANGMUIR selon laquelle il y a uniquement adsorption des savons par les leucocytes, adsorption qui empêcherait l'englobement par suite de la formation d'une ou plusieurs couches orientées.

Le même auteur (57) étudiant in vitro avec la même technique l'action des sels de potassium des acides gras bibasiques sur la phagocytose, constata que les sels de potassium des acides oxalique, malonique, pimélique, n'activent pas in vitro la phagocytose.

L'histamine est selon les expériences de ROCHA e SILVA et O.BIER (124) dépourvue de tout pouvoir chimiotactique sur les leucocytes ; étudiée par H.O.LOOS (98) quant à son effet sur la phagocytose, elle semble augmenter l'intensité de ce phénomène à la concentration de 1/40.000, son principal effet paraissant s'exercer sur les leucocytes.

G.LUDANY, L.BERTA, G.GYORY (99), après avoir étudié l'influence de l'excitation directe des nerfs splanchnique et pneumogastrique sur le phénomène de phagocytose, conclurent que l'excitation du sympathique augmente le pouvoir opsonisant du sérum, tandis que celle du pneumogastrique produit l'effet inverse.

G.BENETATO, C.OPRISIU et I.BACIU (4) affirmèrent le rôle joué par les centres nerveux localisés au niveau de l'hypothalamus dans le déclenchement de la réaction phagocytaire.

Selon L.TABUSSO (132) le pouvoir phagocytaire des leucocytes dans le sérum et en solution physiologique, de même que la phagocytose spontanée du bacille d'Eberth, diminue beaucoup par addition d'acide urique à la solution.

INFLUENCE DE QUELQUES SUBSTANCES CHIMIOTHERAPIQUES -

Dès l'apparition des substances chimiothérapiques, la question se posa de savoir si les médicaments devaient leurs effets à une action directe sur la bactérie, ou s'ils agissaient en favorisant la défense de l'organisme.

Parmi les travaux effectués à ce sujet, nous citerons les expériences suivantes : P.L.RUENSTEIN (125) injecta par voie intra-veineuse à des poules infectées à l'aide de Spirocheta gallinorum du salvarsan, à raison de 0.05 cm³ d'une solution à 1% par kilo. Après des temps variables, les animaux étaient autopsiés ; les vaisseaux des différents organes (cœur, rate, poumon, foie, rein) renfermaient peu de spirochetes et un grand nombre de phagocytes dont aucun ne renfermait de spirochetes dans son protoplasme ; l'auteur en conclut que le salvarsan semble donc agir par destruction directe dans le sang du spirochète sans intervention du phénomène de phagocytose.

J.J.KRITSCHESKI et W.N.AWRECH (78) expérimentant in vivo sur des souris immunisées ne purent jamais mettre en évidence la phagocytose des spirochetes de DUTTON.

Par contre, R.TUNNICLIFF (138) montra par la détermination de l'index phagocytaire que l'injection de néosalvarsan à des lapins, conférait à ces animaux un pouvoir phagocytaire plus élevé vis-à-vis du streptocoque hémolytique.

J.BORDET (12), citant les recherches de CANTACUZENE, rappela que l'injection quotidienne d'iodure de potassium à un lapin permet la résorption rapide de bacilles tuberculeux tués, injectés sous la peau, et considère que l'activité de l'iodure dans certains traitements s'explique par l'excitation du processus phagocytaire qu'il provoque.

Dans son ouvrage, l'auteur signale l'action du chlorhydrate de morphine, de l'antipyrine, du chlorhydrate de cocaïne, de l'atropine et de la quinine, sur la phagocytose.

La phagocytose des bacilles tuberculeux est également augmentée par l'adjonction in vitro au sang de sanochrysine, à condition que la concentration du sel d'or n'excède pas 1/1.000 - H.GARDERE et P.PICHAT (58).

Action des dérivés sulfamidés

Parmi les nombreux travaux parus sur ce sujet nous ne citerons que ceux intéressant directement notre travail.

C.LEVADITI et A.VAISMAN (92) considéraient que le paraaminophenyl-

sulfamide agit en inhibant la production de toxine et la formation de la capsule, ce qui favorise le jeu des défenses naturelles de l'organisme.

Ces mêmes auteurs, en collaboration avec D.KRASSNOFF (96), montraient que la virulence des pneumocoques est fonction du potentiel capsulogène de ceux-ci et que la phagocytose intervient pour débarrasser l'organisme des bactéries dont le moyen de défense le plus efficace, la capsule, a disparu sous l'influence du médicament.

V.KOLLATH et F.RAABE (77) étudièrent le comportement des leucocytes du sang et des tissus au cours de l'infection streptococcique après administration de prontosil et opérèrent, d'une part avec des streptocoques virulents, d'autre part avec des streptocoques avirulents ; si en présence de ces derniers il se forme autour de la région inoculée un rempart leucocytaire s'opposant à la pullulation bactérienne, il n'en est pas de même avec les streptocoques virulents.

Or, après addition de prontosil à ceux-ci la guérison peut être obtenue, le rempart phagocytaire ayant pu se constituer ; le prontosil transforme en somme l'infection par microbes virulents en une infection par microbes avirulents et dès ce moment les leucocytes sanguins peuvent accéder au foyer d'inoculation.

R.TUNNICLIFF (137) avait, quelques années auparavant, étudié l'action du prontosil soluble et du para-aminophényl-sulfamide et constaté qu'in vitro ces produits stimulent l'activité leucocytaire et qu'in vivo, après injection par voie sous cutanée à des souris, ils élèvent également le degré de la phagocytose. Selon le même auteur, la sulfapyridine en solutions salines à des dilutions allant du 1/1.000 au 1/100.000 favorise la phagocytose des streptocoques, type viridans, des staphylocoques et des pneumocoques non capsulés. (139)

Par ailleurs, des streptocoques et des pneumocoques qui se sont développés dans du bouillon contenant 1/1.000 de sulfapyridine montrent une certaine dissociation du type S au type R qui les rend plus facilement phagocytés.

F.HAAG (64) montra récemment que non seulement le Sulfamide mais encore l'acide para-amino-benzoïque se montre capable de renforcer nettement le pouvoir phagocytaire des leucocytes.

A. HENSCHER (70), quant à lui, étudia l'influence du néo-prontosil sur la migration des leucocytes en culture de tissus et constata que le néo-prontosil en solution à 1/1.000 stimulait la vitesse de migration des leucocytes de lapins.

De leurs nombreuses expériences, C. LEVADITI, A.VAISMAN et D.KRASSNOFF (95) tirèrent la conclusion suivante :

" En ce qui concerne les sulfamides, il a été démontré à la suite d'essais réalisés avec le pneumocoque, le streptocoque, le bacille de Friedlander et d'autres bactéries que s'il est prouvé que les médicaments efficaces exercent in vivo une action bactériostatique incontestable, c'est la phagytose qui assure, grâce à l'englobement des bactéries et à leur digestion intracellulaire, l'anéantissement définitif de l'agent pathogène. "

Substances antibiotiques -

Ces dernières années, M. MACHEBOEUF et ses collaborateurs étudièrent au point de vue biochimique le mode d'action de divers antibiotiques.

F.GROS, M.MACHEBOEUF, B.RYBAK, P.LACAILLE (63) étudièrent l'action de la streptomycine sur les bactéries non proliférantes puis, en collaboration avec U..RAMBECH et C.LATERRADE, ces mêmes auteurs (62) firent le point des connaissances actuelles sur le mode d'action de la pénicilline.

Plus récemment C.LATERRADE et M.MACHEBOEUF (81) étudièrent le mode d'action de la polymyxine.

Dans son livre intitulé "La Pénicilline et ses applications thérapeutiques", C. LEVADITI (88), après avoir étudié le rôle de la phagocytose in vivo chez des animaux traités à la pénicilline après injection de pneumocoques, de streptocoques hémolytiques, de staphylocoques, formule la conclusion suivante : "En définitive, c'est surtout grâce à l'intervention ultime du système défensif de l'organisme, et, en particulier de la phagocytose, que l'activité stérilisante de la pénicilline s'exerce".

Quelques années plus tard ce même auteur, en collaboration avec J.VAILLET (97) étudia le rôle des défenses phagocytaires dans le mécanisme d'action de la streptomycine in vivo. Le processus de destruction des bactéries apparaît différent selon que les bactéries possèdent ou non une capsule. Dans le cas du staphylocoque, du colibacille, le rôle de la phagocytose apparaît tout aussi important que dans le cas de la pénicilline ou des sulfamides ; par contre, dans le cas de la bactérie charbonneuse ou du pneumobacille de Friedlander, bactéries encapsulées, la streptomycine, après avoir détruit la capsule, se montre capable de tuer et de lyser les bactéries. Dans ce cas le rôle de la phagocytose apparaît très effacé.

B - TECHNIQUES D'ETUDE DE LA PHAGOCYTOSE

Différentes techniques ont été proposées et appliquées pour l'étude de la phagocytose.

Nous rappellerons brièvement les techniques qui sont actuellement le plus couramment utilisées ; nous verrons que leur diversité et les conceptions parfois opposées sur lesquelles elles ont été établies suffisent à expliquer les divergences dans les résultats obtenus par les divers auteurs.

La méthode imaginée par W.B.LEISHMAN (87) et mise au point par A.E.WRIGHT et S.R.DOUGLAS, consiste à déterminer le nombre moyen de particules englobées par leucocyte en un temps donné.

Nous exposerons ici la technique de A.E.WRIGHT et S.R.DOUGLAS (145), technique destinée à mesurer in vitro le pouvoir opsonisant d'un sérum, c'est-à-dire l'action favorisante que ce sérum peut exercer sur la phagocytose.

Une suspension de leucocytes en sérum physiologique est mélangée à parties égales avec une suspension de bactéries en sérum physiologique et avec du sérum à étudier ; le mélange est effectué à l'aide d'une pipette marquée d'un repère à 1 ou 2 centimètres de l'extrémité, le gros bout de la pipette étant muni d'une tétine de compte gouttes en caoutchouc. L'émulsion microbienne est aspirée jusqu'au repère, puis on introduit un peu d'air sur une longueur de 1 cm environ ; une quantité de suspension leucocytaire provenant d'un exsudat péritonéal, égale à la quantité d'émulsion microbienne est aspirée à son tour ; puis une nouvelle bulle d'air ; enfin le sérum à tester est aspiré également jusqu'au repère. A.E.WRIGHT recommande de toujours faire ces opérations dans le même ordre ; le contenu de la pipette est alors mélangé par une série de projections et d'aspirations successives sur un verre de montre.

Le mélange est laissé à l'étuve à 37°C pendant 15 à 20 minutes ; une goutte est étalée et colorée.

La numération s'effectue en comptant les microbes contenus dans un nombre assez grand de leucocytes (100 au minimum) de façon à diminuer l'erreur relative, et la moyenne du nombre de microbes contenue par leucocyte est calculée ; ce chiffre moyen, coefficient phagocytaire, ou index phagocytaire, représente le "pouvoir opsonisant" du sérum pour les leucocytes et les microbes employés ; pour que ce chiffre ait une valeur en soi, il fallait le comparer avec celui obtenu en expérimentant avec un sérum normal ; l'index opsonique est le rapport existant entre le pouvoir opsonisant du sérum à examiner et le pouvoir opsonisant du sérum normal.

Cependant la numération des bactéries, comme l'expérience nous l'a montré, est parfois difficile ; il arrive que la formation d'amas leucocytaire introduise une cause d'erreur ; à ce sujet, P.ESCHE (51) recommanda pour la préparation des suspensions bactérienne et leucocytaire de centri-

fuger longtemps mais à vitesse réduite lors des lavages ; d'autre part ce même auteur conseilla pour éviter l'agglomération des cellules phagocytaires sur le frottis, de faire en sorte que la dilution du sérum et de la suspension bactérienne soit dans le rapport de 10/2 ou 10/1.

F.NEUFLED(115) proposa, en 1910, la technique suivante : les leucocytes étaient obtenus en injectant dans le péritoine d'un cobaye du bouillon chargé d'aleurone ; l'animal était sacrifié après 24 heures et la cavité péritonéale lavée à plusieurs reprises avec de l'eau physiologique ; après centrifugation, les leucocytes étaient émulsionnés en eau physiologique ; F.NEUFLED utilisait des émulsions microbiennes très concentrées, obtenues à partir de cultures sur gélose de 24 heures, dans un mélange à parties égales de bouillon et d'eau physiologique.

Dans de petits tubes, il ajoutait aux dilutions de sérum à titrer une goutte d'émulsion bactérienne et deux gouttes d'émulsion leucocytaire (1/20 et 1/10 de cm³). Après 1 h 1/2 de contact à 37°C, des frottis très minces étaient effectués, fixés à l'alcool éther et colorés au bleu de méthylène.

Au cours de ses recherches sur la phagocytose, L.SEGUIN (127) utilisait une technique très voisine de celle de F.NEUFLED. Plus récemment, E.J.HAMBERGER et W.O.FENN mirent au point de nouvelles techniques.

H.J.HAMBERGER (65) détermina le pourcentage de phagocytes englobant les particules mises en contact en un temps donné ; ce fut cette méthode qu'adoptèrent S.LUDD, MORTON et CUTCHEON et B.LUCIE (111) dans leurs travaux.

Dans la méthode de H.J.HAMBERGER (65), il n'est pas tenu compte du degré de la phagocytose mais uniquement du nombre de cellules possédant la faculté de phagocyter les bactéries. Selon l'auteur le degré de la phagocytose est une fonction logarithmique du pourcentage de leucocytes doués de pouvoir phagocytaire et il suggère que la détermination de l'index opsonique peut être simplifiée par la numération des leucocytes contenant des bactéries.

Quant à W.O.FENN (53) il part d'un système phagocytaire contenant un nombre connu de cellules et de particules de quartz ou de carbone ; puis il détermine le nombre de particules non englobées en fonction du temps. Cette méthode permet ainsi de mesurer le nombre de particules englobées.

H.J.HAMBERGER et W.O.FENN modifièrent la technique de WRIGHT, car ils effectuèrent en général leurs expériences sur la phagocytose en employant des particules soit de quartz, soit de carbone. Comme le dit W.O.FENN dans son mémoire original (53), en parlant de la technique de WRIGHT : "il est impossible d'opérer ainsi avec des particules solides qui sont généralement plus grosses que les bactéries et qui peuvent par ce fait remplir la cellule en un temps très court".

Ces dernières années, A.DELAUNAY (23), au cours de sa longue série

d'études sur la phagocytose, utilisa la technique suivante : il met en contact dans de petits tubes à hémolyse à 0,5 cm³ d'une dilution bactérienne assez concentrée et 0,5 cm³ d'exsudat leucocytaire obtenu par ponction péritonéale chez un cobaye ayant reçu quelques heures plus tôt 5 cm³ de bouillon stérile.

Après une agitation suffisante pour obtenir un mélange homogène, le tube est laissé 1 heure à 37°C ; pendant ce temps, bacilles et polynucléaires se sédimentent au fond du tube. Après une heure le liquide surnageant est décanté, le dépôt prélevé à l'aide d'un écouvillon est étalé sur une lame. L'examen est précédé par une simple coloration au bleu de méthylène.

Nous terminerons l'exposé de ces différentes techniques en citant celle de H.GARDERE et P.J.PICHAT (58) qui, au cours d'un travail sur la phagocytose du bacille tuberculeux, étudièrent le pouvoir phagocytaire des leucocytes au sein de leur propre plasma rendu incoagulable, sans adjonction de sérum étranger : 1 cm³ de sang prélevé par ponction veineuse est recueilli dans une coupelle paraffinée ; 2 gouttes d'une émulsion de bacilles de Koch en eau physiologique, contenant 400 millions de bacilles par cm³ sont mélangées à ce sang ; le tout est porté à l'étuve à 37°C. Une goutte est prélevée à la quinzième et à la trentième minute, étalée sur lame et colorée par la méthode de Ziehl.

Les auteurs indiquent que l'on peut utiliser du sang défibriné dans un flacon contenant des perles de verre ; par contre, il faut s'abstenir de citrater le sang.

DEUXIEME PARTIE

ESSAIS PERSONNELS

Nos essais personnels ont consisté à rechercher le comportement à l'égard du phénomène de phagocytose des bactéries préalablement traitées par des doses inférieures aux doses bactériostatiques de diverses substances antiseptiques ou antibiotiques.

Nous examinerons, tout d'abord, les conditions que nous avons adoptées pour déterminer les concentrations des substances inhibitrices à mettre en expérience. Nous décrirons ensuite les expériences de phagocytose effectuées sur les bactéries traitées et celles qui ont eu pour but de rechercher l'influence de divers facteurs expérimentaux sur le phénomène étudié.

I - ETUDE DE LA PHAGOCYTOSE DES BACTERIES SOUMISES PREALABLEMENT
A L'ACTION DES SUBSTANCES INHIBITRICES

A - FIXATION DES CONDITIONS EXPERIMENTALES

1) RECHERCHE DES DOSES BACTERIOSTATIQUES -

Pour déterminer les doses bactériostatiques des différentes substances en essai, nous avons utilisé la technique des dilutions mise au point par S.LAMBIN (79).

Dose antigénétique (ou bactériostatique) -

La dose antigénétique d'une substance est définie comme étant la quantité de cette substance qu'il suffit d'ajouter à un litre de bouillon de culture pour y empêcher le développement d'une quantité connue de germes, dans des conditions favorables.

L'inverse de cette dose représente le "Pouvoir antigénétique" de la substance considérée, ce dernier pouvant être défini par la faculté que possède cette substance de suspendre temporairement la vie de ce germe ou de s'opposer à son développement dans un milieu où se trouvent réalisées les conditions optima.

Détermination de la dose antigénétique -

Technique -

Ayant préparé au moment de l'essai les solutions de la substance à étudier, la suspension de germes à concentration voulue, on dispose une série de tubes stériles contenant chacun 2.5 cm³ de bouillon peptoné salé à concentration double.

On ajoute, dans chaque tube, un volume fixe de la suspension bactérienne, de titre connu, puis on ajoute dans chaque tube des quantités croissantes de la solution dont on veut déterminer le pouvoir antigénétique ; finalement on complète le volume du liquide contenu dans chaque tube avec de l'eau distillée stérile, de façon à obtenir un volume total de 5 cm³.

Ainsi, les 2.5 cm³ de bouillon peptoné salé à concentration double contenus initialement dans chaque tube se trouvent finalement portés à concentration normale.

Il faut en général procéder par tâtonnement pour l'établissement de ces gammes car il est rare, à moins d'avoir une idée précise du pouvoir antigénétique du produit, de pouvoir obtenir des résultats avec une gamme trop étroite ; il est bon de faire un premier essai avec une gamme très étendue, puis de recommencer les essais ultérieurs avec des gammes de plus en plus resserrées jusqu'à obtention d'un résultat suffisamment précis.

La lecture des résultats est effectuée dans les conditions suivantes : les tubes capuchonnés sont laissés au besoin quelques jours à la température du laboratoire, si la substance essayée est volatile, avant d'être placés à l'étuve à 37° C pendant 4 jours pour s'assurer qu'aucun développement ne se produit ; la dose de substance antiseptique contenue dans le dernier tube qui a été cultivé, est notée, ainsi que la dose contenue dans le premier tube resté stérile ; la moyenne des deux chiffres est considérée comme représentant la "dose antigénétique" du produit.

Cette dose est exprimée en grammes par litre ; dans les expériences effectuées avec la pénicilline et la streptomycine, les doses antigénétiques ne seront pas exprimées ainsi mais en unités par cm³ de milieu.

Pour nos expériences, désirant opérer sur des germes jeunes, nous avons systématiquement effectué la lecture des résultats après 24 heures d'incubation à l'étuve à 37° C, quel que fût le produit dont nous voulions déterminer la dose antigénétique ; d'ailleurs nous n'avons affaire à aucune substance volatile.

Le milieu de culture utilisé était le bouillon peptoné salé classique, mais à concentration double, correspondant à la formule suivante :

viande de boeuf, dégraissée, hachée : 1.000 g
 peptone : 20 g
 chlorure de sodium : 10 g
 eau distillée : 1.000 g

Afin d'assurer à nos milieux une composition aussi constante que possible, nous avons toujours utilisé la même qualité de peptone dont nous avons fait provision.

Disposant d'une certaine quantité d'extrait de viande au début de nos expériences, nous avons songé à utiliser cet extrait ; des expériences préliminaires nous ayant montré que les milieux préparés avec cet extrait donnaient des poussées microbiennes nettement inférieures à celles obtenues dans les milieux préparés à partir de la viande, nous avons abandonné l'utilisation de cet extrait.

Chaque préparation de bouillon était effectuée de telle sorte que la quantité obtenue fut suffisante pour l'exécution de nombreux essais.

La répartition du bouillon en ballons de faible contenance évitait des stérilisations répétées.

La conservation était assurée par maintien à la glacière.

Substances inhibitrices et souches microbiennes en expérience -

Nous avons utilisé trois corps antiseptiques classiques choisis à dessein dans des groupes différents : l'iode, le phénol, le chlorure mercurique et deux substances antibiotiques : la pénicilline et la streptomycine.

Les souches microbiennes mises en expérience étaient :

Une souche de Staphylococcus aureus (souche Oxford)

- " " d'Escherichia coli de la collection de la Faculté de Pharmacie
- " " de Klebsiella pneumoniae
- " " Pseudomonas aeruginosa, souche Gessard
- " " de Bacillus mesentericus.

Les essais portant sur le pneumocoque et le streptocoque ont été abandonnés en raison des difficultés expérimentales apportées par la nécessité de cultiver ses germes en milieux contenant du sérum ou du liquide d'Ascite, ce qui risquait de modifier l'action de certains antiseptiques, celle du chlorure mercurique par exemple, et ce qui, par ailleurs, eut totalement modifié nos conditions expérimentales.

Ces obstacles eussent pu, évidemment, être surmontés, mais la poussée irrégulière des germes et l'obtention répétée de résultats aberrants nous ont engagé à renoncer à une étude quantitative effectuée sur ces deux germes.

Protocole d'un Essai -

Préparation des suspensions microbiennes -

Les suspensions microbiennes ont été préparées à partir de cultures sur gélose âgées de 24 heures. En ce qui concerne le Bacillus mesentericus, nous avons opéré avec des cultures de 48 heures ; les suspensions ont été effectuées en eau distillée stérile contenue dans de gros tubes à essais Pyrex contenant quelques billes de verre.

Les bactéries soigneusement prélevées avec une anse de platine à la surface de la gélose, en ayant soin de ne pas entraîner de parcelles de cette dernière, sont dilacérées sur la paroi du tube, légèrement au-dessus du niveau de l'eau, puis peu à peu mises en suspension.

Les billes de verre permettent par la suite d'obtenir une homogénéisation parfaite ; une partie de la suspension est introduite dans la cuve de l'appareil de Meunier et la densité optique est mesurée.

Nous avons dans toutes nos expériences utilisé des suspensions de germes contenant 200.000.000 de germes par cm^3 de telle sorte qu'un volume de 0.25 cm^3 de ces suspensions ajouté dans chaque tube y détermine une concentration de 10.000.000 de bactéries par cm^3 .

Nous avons admis au cours de nos essais que pour les suspensions peu concentrées, la densité optique était proportionnelle à la concentration en bactéries ; d'après l'examen des courbes que nous avons établies, il ressort que l'origine de la courbe peut être pratiquement considérée comme une droite jusqu'à une densité optique correspondant à 100 et même 150 divisions du tambour ; or, dans tous les cas ces points correspondent à des concentrations microbiennes très supérieures à celles que nous utilisons.

Nous attirons l'attention sur le fait que nous utilisons des suspensions contenant 200 millions de germes par cm^3 , tandis que les chiffres exprimés sur les courbes montrant la variation de la densité optique en fonction du nombre de germes, indiquent le nombre de bactéries par mm^3 .

Exemple de détermination de la dose antigénétique de l'iode -

sur Pseudomonas aeruginosa (souche Gessard)

Nous avons préparé une solution d'iode relativement concentrée

à 1 % selon la formule suivante :

iode	1 g
iodure de potassium	2 g
eau distillée	100 cm ³

cette solution mère a été utilisée au cours des essais après dilution convenable.

Après avoir dans un portoir disposé une série de six tubes contenant chacun 2.5 cm³ de bouillon à concentration double, nous ajoutons dans chacun une même quantité de suspension bactérienne, soit 0.25 cm³, puis des doses croissantes de solution iodo iodurée.

Comme il s'agissait d'un premier essai nous avons utilisé une gamme très étendue et calculé les quantités de solution iodo iodurée de telle sorte que les concentrations en iode s'étendent de 0.001 gramme pour mille dans le premier tube, à 1 gramme pour mille dans le dernier tube.

Il était impossible dans ces conditions d'utiliser une seule dilution iodo iodurée, le volume maximum que l'on puisse ajouter étant de 2.25 cm³.

Aussi avons-nous ajouté, dans les deux premiers tubes de la série, des volumes croissants de la solution iodo-iodurée contenant 0.025 g pour 1.000 d'iode et dans les quatre derniers des volumes croissants de solution iodo-iodurée contenant 2.5 g pour 1.000 d'iode.

Pour obtenir des solutions possédant les titres indiqués ci-dessus, nous avons opéré par dilutions successives de façon à ne jamais avoir à mesurer de trop petits volumes, ceci afin de réduire au minimum les erreurs.

a) Pour obtenir la dilution à 2.5 g pour mille d'iode, nous avons mesuré 2 cm³ de la solution d'iode à 1 pour cent auxquels nous avons ajouté 6 cm³ d'eau distillée stérile.

b) Pour obtenir la dilution à 0.025 g pour mille d'iode, nous avons opéré une série de dilutions à partir de la solution précédente.

Des quantités d'eau distillée stérile, telles que le volume final contenu dans chaque tube fut de 5 cm³, étaient finalement ajoutées ; chaque tube était agité de façon à homogénéiser son contenu, capuchonné et placé à l'étuve à 37° C pendant 24 heures ; le lendemain la lecture était effectuée.

Dans le tableau suivant qui schématise le protocole d'un essai, les tubes dans lesquels s'est manifesté un développement bactérien sont marqués du signe (+), que le développement se soit manifesté par l'apparition d'un trouble marqué du bouillon, ou que celui-ci soit resté clair, surnageant un net dépôt microbien.

Par contre, les tubes dans lesquels aucun développement microbien n'est apparu, sont marqués du signe (-).

Schéma de l'essai n° 1

Numéro des tubes	1	2	3	4	5	6
Bouillon double (cm ³)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Suspension microbienne "	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Solution iodo-iodurée "	0.20	2.	0.10	0.40	1.	2.
Eau distillée stérile "	2.05	0.25	2.15	1.85	1.25	0.25
Concentration en g pour mille	0.001	0.01	0.05	0.20	0.50	1.
Lecture après 24 heures	+	+	+	+	-	-

Dans les tubes 1 et 2, solution iodo-iodurée à 0.025 g pour mille
 Dans les tubes 3, 4, 5, 6, " " " à 2.5 g pour mille.

Ce tableau nous permet de constater que 0.4 cm³ de solution iodo-iodurée à 2.5 g p. mille n'entravent pas la poussée microbienne qui se trouve par contre inhibée par l'addition de 1 cm³ de cette même solution.

La dose antigénétique, exprimée en grammes et rapportée au litre se trouve donc comprise entre 0.20 et 0.50.

Pour obtenir un résultat plus précis, nous avons recommencé cet essai en resserrant la gamme de façon à obtenir des concentrations en iode variant de 0.20 g à 0.70 g pour mille ; dans le cas particulier qui nous occupe, nous avons pu utiliser pour ce nouvel essai la solution à 2.5 g pour mille d'iode, mais en règle générale quand, dans la confection d'une nouvelle gamme, nous étions amenés à utiliser des volumes croissants, différant l'un de l'autre de moins de 0.10 cm³, nous diluions la solution de façon à introduire toujours dans deux tubes voisins des volumes de solution différent au minimum de 0.10 cm³.

Essai n° 2 -

Numéro des tubes	1	2	3	4	5	6
Bouillon double (cm ³)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Suspension microbienne "	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Solution iodo-iodurée "	0.40	0.60	0.80	1	1.20	1.40
Eau distillée stérile "	1.85	1.65	1.45	1.25	1.05	0.85
Concentration en g pour mille	0.20	0.30	0.40	0.50	0.60	0.70
Lecture après 24 heures	+	+	-	-	-	-

Dans tous les tubes solution iodo-iodurée à 2.5 g pour 1.000, la dose antigénétique ainsi déterminée se trouve comprise entre 0.30 et 0.40.

Un troisième essai fut alors effectué en resserrant à nouveau la gamme ; nous n'avons pas cependant réalisé une gamme trop étroite car l'expérience nous avait montré au préalable que, dans ce cas, la lecture des résultats devient très difficile ; entre le premier tube présentant une poussée microbienne nette et le premier tube resté parfaitement limpide, peuvent s'intercaler 1, souvent 2 tubes dans lesquels la poussée microbienne excessivement faible rend la lecture difficile.

Le troisième essai fut effectué de la façon suivante :

Essai n° 3

Numéro des tubes	1	2	3	4	5	6
Bouillon double (cm ³)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Suspension microbienne "	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Solution iodo-iodurée "	0.50	0.60	0.70	0.80	0.90	1
Eau distillée stérile "	1.75	1.65	1.55	1.45	1.35	1.25
Concentration en g pour mille	0.25	0.30	0.35	0.40	0.45	0.50
Lecture après 24 heures	+	+	-	-	-	-

Dans tous les tubes solution iodo-iodurée à 2.5 g pour 1.000
La dose antigénétique d'iode est donc, d'après les conventions que nous
avons fixées de : 0.325 g pour mille.

Nous avons ainsi recherché les doses antigénétiques de l'iode,
du phénol, du chlorure mercurique, de la pénicilline et de la strepto-
mycine, vis-à-vis de différentes espèces bactériennes : Staphylococcus
aureus, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Klebsiella pneumoniae
et Bacillus mesentericus.

Les trois premières substances nous ont conduit aux résultats
suivants. (la dose bactériostatique ou antigénétique est exprimée en
grammes par litre) :

	Iode	Phénol	Chlorure mercurique
<u>Staphylococcus aureus</u>	0.32	2.12	0.003
<u>Escherichia coli</u>	0.52	1.75	0.004
<u>Pseudomonas aeruginosa</u>	0.325	1.10	0.002
<u>Klebsiella pneumoniae</u>	0.30	1.10	0.002
<u>Bacillus mesentericus</u>	0.30	1.10	0.003

Dans le cas de la pénicilline, nous avons dû nécessairement,
ne disposant pas de quantités suffisantes de pénicilline étalon, utiliser
de la pénicilline commerciale dont nous devons vérifier le titre par
rapport à une solution de pénicilline étalon, au moment de l'essai (1).

Ces vérifications ont été effectuées selon les méthodes classi-
ques de titrage de la pénicilline.

Rappelons qu'une conférence internationale réunie à Londres en
1944, a adopté comme étalon international un sel sodique pur cristallisé
de pénicilline H dont quelques grammes sont conservés à Londres ; un
milligramme de ce produit contient 1.650 unités de pénicilline, ce qui
revient à dire qu'une unité de pénicilline pèse environ 6/10.000 de
milligramme de cette poudre.

Deux méthodes de titrage avaient été proposées et deux unités
établies avant l'adoption de ce standard :

- 1) l'unité Heatley : quantité de pénicilline qui, diluée dans
un cm³, détermine autour de son point d'application, une

(1) Nous tenons à remercier Monsieur BOUE qui nous a toujours très aimable-
ment fourni les solutions étalons dont nous avons besoin pour
nos essais.

zone d'inhibition de 24 mm ; l'unité Heatley correspond à environ 6/10.000 de milligramme.

- 2) 1'unité Oxford : quantité minimale de pénicilline qui, dissoute dans 50 cm³ de bouillon de viande, inhibe complètement la croissance d'une souche type de staphylocoque doré.

Après dissolution de la pénicilline dans un volume d'eau distillée stérile tamponnée et dilutions appropriées, nous obtenions une solution de pénicilline que nous comparions à une solution étalon de la façon suivante :

La solution étalon était diluée de façon à ce que son titre fut exactement de 0.3 U/cm³. D'autre part, la pénicilline à titrer était dissoute dans une solution tampon stérile répondant à la formule suivante:

phosphate monopotassique anhydre.....	9 g
" di " "	15 g
eau distillée q.s.p.	1.000 cm ³

une partie aliquote était diluée de telle sorte que, d'après son activité présumée, cette dilution eut un titre de 0.3 U/cm³.

L'espèce microbienne utilisée pour le dosage était Staphylococcus aureus, souche Oxford ; après ensemencement de 5 cm³ de bouillon et mise à l'étuve à 37° C pendant 24 heures, 0 cm³ 10 de cette première culture était repiquée dans 5 cm³ de bouillon neuf. La seconde culture obtenue après 24 heures d'incubation à 37° C était diluée au 1/1.000 et utilisée pour l'ensemencement des tubes.

Deux séries de 12 tubes contenant chacun 4 cm³ de bouillon stérile étaient préparées : l'une servant pour la solution étalon, l'autre pour la solution à titrer.

Des volumes décroissants des deux solutions étaient introduits aseptiquement dans chaque tube à l'aide de pipettes stériles ; dans chaque tube était ajoutés 0.5 cm³ de la dilution au millième de staphylocoques. Soient :

- u : le volume de la solution étalon contenu dans le tube limite de la série étalon,
- V : le volume total de ce tube,
- u' : le volume de la solution à titrer contenu dans le tube limite de la série de titrage,
- V' : le volume total de ce tube,
- d : la dilution effectuée pour amener l'échantillon à 0.3 U/cm³ présumé.

Nous avons :

N° des tubes	Volume de la dilution u ou u'	Volume total V ou V'
1	1.5	6
2	1.25	5.75
3	1.1	5.6
4	1	5.5
5	0.9	5.4
6	0.8	5.3
7	0.75	5.25
8	0.70	5.20
9	0.65	5.15
10	0.60	5.10
11	0.55	5.05
12	0.50	5

Après 20 heures d'incubation à 37° C des deux séries de tubes, la lecture était effectuée ; est considéré comme tube limite du titrage le dernier tube ne présentant pas trace de culture.

L'activité de l'échantillon sera donnée par la formule :

$$x = 0.3 \frac{u'}{u} \times \frac{V}{V'} \times d$$

comme $0.3 d = h$, hypothèse émise pour effectuer la dilution :

$$x = \frac{u'}{u} \times \frac{V}{V'} \times h$$

Pour obtenir une bonne précision, il est bon de faire en double ou en triple ces dosages et d'effectuer les calculs avec les moyennes des différents chiffres obtenus.

Les résultats suivants ont été trouvés :

	en U.O par cm ³	en mg pour 1.000
<u>Staphylococcus aureus</u>	0.05	0.03
<u>Escherichia coli</u>	60	36
<u>Pseudomonas aeruginosa</u>	10.000	6.000
<u>Klebsiella pneumoniae</u>	8	4.8
<u>Bacillus mesentericus</u>	5	1.8

Détermination des doses antigénétiques de la streptomycine -

Pour exprimer l'activité de la streptomycine, on a d'abord utilisé l'unité biologique S déterminée par WAKSMAN : cette unité était la quan-

tité de streptomycine capable d'inhiber complètement la multiplication d'une souche définie de colibacille dans 1 cm³ de bouillon nutritif ou d'agar agar.

Ultérieurement, le pouvoir antibactérien de la streptomycine fut déterminé à partir de deux étalons : un étalon de base et un étalon de travail ; ce dernier était constitué par un lot spécial, de préparation homogène, d'un sel de streptomycine dont l'activité a été évaluée par comparaison avec l'étalon de base.

Dans ces conditions, l'unité dite unité "G" représente l'activité de la streptomycine contenue dans 1.38 microgramme d'étalon de base, séché pendant 4 heures à 50° C, cette unité correspond pratiquement à l'activité de 1 microgramme de streptomycine base pure (1 : 1)

C'est cette unité que nous avons utilisé.

Résultats obtenus au cours de nos essais avec la Streptomycine -

	<u>en unité par cm³</u>	<u>en mg pour 1000</u>
<u>Staphylococcus aureus</u>	15	15
<u>Escherichia coli</u>	25	25
<u>Pseudomonas aeruginosa</u>	15	15
<u>Klebsiella pneumoniae</u>	2	2
<u>Bacillus mesentericus</u>	0,8	0,8

Tableau récapitulatif des résultats obtenus :

	Doses antigénétiques exprimées en grammes pour mille			doses antigénétiques exprimées en milligrammes pr.1000	
	Iode	Phénol	Chlorure mercurique	Pénicilline	Streptomycine
<u>Staphylococcus aureus</u>	0.32	2.12	0.003	0.03	15
<u>Escherichia coli</u>	0.52	1.75	0.004	36	25
<u>Pseudomonas aeruginosa</u>	0.325	1.10	0.002	6.000	15
<u>Klebsiella pneumoniae</u>	0.30	1.10	0.002	4.8	2
<u>Bacillus mesentericus</u>	0.30	1.10	0.003	1.8	0.8

2) METHODES DE DETERMINATION DU NOMBRE DE BACTERIES ET DE LEUCOCYTES MIS EN EXPERIENCE -

Il faut pour interpréter avec exactitude les résultats obtenus au cours de différents essais de phagocytose, que le rapport existant entre le nombre des bactéries et celui des leucocytes soit maintenu constant. Aussi, avons-nous dû titrer néphélométriquement, lors de chaque essai, la suspension bactérienne mise en expérience et utiliser non pas l'exsudat péritonéal d'un seul animal, mais un mélange de plusieurs exsudats péritonéaux, ce qui tend, comme l'expérience l'a montré, à uniformiser le nombre de leucocytes par unité de volume. J. HANKS (.66), qui étudia ce point particulier, put en effet constater, que pour un nombre fixe de leucocytes et un nombre croissant de bactéries, le pourcentage des cellules manifestant une action phagocytaire augmente ; par ailleurs, le nombre moyen de bactéries ingérées par leucocyte est d'autant plus élevé que le nombre de bactéries présentes est lui-même plus grand. Inversement, le nombre de bactéries restant fixe, si le nombre des leucocytes augmente, le pourcentage des cellules phagocytaires apparaît moins grand, bien que l'activité du système soit finalement supérieure. Si le nombre des bactéries et celui des leucocytes augmente en même temps, on constate dans l'unité de temps une action plus marquée des leucocytes sur les bactéries.

Plus récemment, A. DELAUNAY (23) souligna l'influence de la concentration en bactéries sur la phagocytose ; il put ainsi constater qu'avec une dilution très pauvre en bactéries, la phagocytose reste toujours peu marquée, tandis qu'elle augmente considérablement avec une dilution très riche en germes. Au cours de ses expériences, A. DELAUNAY utilisa une suspension microbienne contenant 1.600×10^6 bactéries par cm^3 et opéra un mélange à parties égales avec un exsudat péritonéal obtenu sur cobaye.

S.S. BHATNAGAR (5) employait une suspension microbienne de concentration identique et opérait le mélange suivant :

suspension leucocytaire	0 cm^3	3
suspension bactérienne	0 cm^3	1
sérum.....	0 cm^3	1

Au cours de nos essais personnels, nous avons utilisé des suspensions de bactéries contenant 200 millions d'éléments par cm^3 ; après quelques expériences préliminaires, ce nombre a été retenu comme étant le plus favorable pour satisfaire aux conditions suivantes :

- 1°) il assure une phagocytose suffisante, compte tenu du nombre de leucocytes mis en jeu ;
- 2°) il permet d'obtenir une phagocytose moyenne, se prêtant encore à une numération relativement facile,
- 3°) il assure dans chaque cas la préparation de la suspension bactéri-

rienne. Les émulsions microbiennes étant préparées à partir de germes qui se sont multipliés au contact des antiseptiques ou antibiotiques étudiés, il en résulte que le développement bactérien est d'autant plus faible que la quantité de substance antiseptique ou antibiotique est plus forte. Après centrifugation il est nécessaire de remettre le culot microbien dans un volume minimum d'eau physiologique (5 cm³) afin de pouvoir effectuer la mesure néphélométrique à l'électrophotomètre de Meunier.

Ce volume minimum de 5 cm³ et le développement parfois très faible des bactéries nous a conduit à limiter la concentration des suspensions bactériennes que nous utilisions pour l'étude de la phagocytose.

Détermination du nombre de leucocytes dans les exsudats péritonéaux -

Nous avons effectué la numération des leucocytes contenus dans divers exsudats péritonéaux de cobayes, d'une part immédiatement après leur prélèvement, d'autre part après des intervalles de temps déterminés : 1/2 heure, 1 heure, 1 heure 1/2.

On peut constater, en effet, que les leucocytes se sédimentent et adhèrent rapidement aux parois du récipient dans lequel on les a recueillis ; une simple agitation est insuffisante à les remettre en suspension et tout autre procédé serait susceptible de les léser.

Nous avons utilisé l'hématimètre de Malassez pour effectuer ces numérations ; après avoir déposé une goutte de l'exsudat péritonéal dilué au 1/20 dans l'eau physiologique, déposé une lamelle et laissé sédimenter les leucocytes, nous avons dénombré les leucocytes contenus dans différentes bandes composées chacune de 10 rectangles correspondant chacun à 1/100 de mm³.

Nous avons effectué la moyenne des nombres de leucocytes contenus dans chaque bande et multiplié ce résultat par 200 pour avoir le nombre de leucocytes par millimètre cube (la dilution est au 1/20 et chaque bande correspond à 1/10 de mm³).

Les résultats suivants ont été obtenus :

Nombre de leucocytes par mm³ d'exsudat péritonéal :

Numération effectuée	immédiatement	après 1/2 h.	après 1 h.	après 1 h. 1/2
Exsudat n° 1	26.500	17.200	13.200	11.200
" n° 2	20.200	13.000	11.100	8.900
" n° 3	20.500	14.600	12.000	9.200
" n° 4	19.400	12.700	11.700	8.800
" n° 5	21.700	15.000	11.500	8.400
" n° 6	27.000	18.500	12.800	10.400

Nous avons également effectué différentes numérations sur des mélanges d'exsudats péritonéaux provenant de plusieurs cobayes (3 en général). Les résultats obtenus au cours de 5 essais différents ont été les suivants :

Nombre de leucocytes par mm³ de mélange d'exsudats péritonéaux :

Numération effectuée	immédiatement	après 1/2 h.	après 1 h.	après 1 h. 1/2
Essai n° 1	23.600	15.100	12.200	9.600
" n° 2	22.800	15.500	12.300	9.800
" n° 3	22.100	14.500	11.800	9.200
" n° 4	24.200	16.100	12.500	10.000
" n° 5	22.700	15.200	11.800	9.400

L'examen de ces tableaux permet de constater une rapide diminution du nombre des leucocytes par mm³.

Par ailleurs, il apparaît que le nombre de leucocytes par mm³ varie d'une façon assez sensible d'un exsudat à l'autre ; cette variation est beaucoup moins sensible quand il s'agit de mélange de différents exsudats péritonéaux. Dans le premier cas, l'écart maximum est de 28 %, dans le second cas de 8,7 %.

Ceci nous a conduit, lors de nos essais ultérieurs, à ajouter

les bactéries au mélange de plusieurs exsudats péritonéaux immédiatement après le prélèvement de ceux-ci, de façon à introduire un nombre aussi constant que possible de leucocytes.

Détermination de la concentration des suspensions bactériennes -

Afin de pouvoir disposer de suspensions microbiennes de concentration constante au cours de nos expériences, nous avons, dans un premier stade, à l'aide de l'électrophotomètre de Meunier, établi les courbes des densités optiques des suspensions microbiennes à l'étude, en fonction de leur concentration en bactéries.

Nous avons adopté, pour effectuer la numération des bactéries contenues dans les suspensions dont nous venons de déterminer la densité optique, la technique de WRIGHT FRILES. Elle consiste à mélanger des volumes connus de la suspension bactérienne à l'étude et d'une suspension titrée de cellules de levures, puis à déterminer la proportion de bactéries et de cellules de levures.

Technique :

Des suspensions relativement denses de bactéries furent préparées à partir de cultures de 24 heures sur gélose inclinée, en eau physiologique stérile.

A partir de la suspension mère bien homogénéisée dans un gros tube à essais Pyrex contenant quelques billes de verre, fut préparée une seconde suspension dix fois moins concentrée ; c'est à partir de cette seconde suspension que fut effectuée une première numération : 2 cm³ de cette suspension furent mélangés à 2 cm³ d'une suspension de cellules levures préparée de la façon suivante :

1.50 gramme, environ, de levure de boulangerie fut triturée dans un mortier avec 100 cm³ d'eau physiologique jusqu'à obtention d'un mélange parfaitement homogène ; cette suspension étant trop concentrée la numération des cellules levures fut effectuée sur une dilution au 1/10 à l'aide de la cellule de Malassez.

Le nombre de cellules levures contenues dans une douzaine de rectangles correspondant chacun à 1/100 de mm³ fut déterminé et les résultats furent les suivants :

Premier montage :

191, 198, 213, 211, 213, 220
soit un total de 1.246

Second montage :

195, 197, 184, 224, 223, 189
soit un total de 1.212.

Le nombre de cellules levures contenues par mm³ est :

$$\frac{1.246 + 1.212}{12} \times 100 = 20.500$$

Au cours d'une première numération nous avons établi le rapport existant entre cellules levures et cellules microbiennes en partant du mélange :

suspension mère de cellules levures contenant

205.000 cellules par mm³

suspension microbienne au 1/10.

Après homogénéisation du mélange, une goutte de celui-ci était prélevée et étalée sur une lame de verre parfaitement propre ; les lames étaient traitées au mélange sulfo-chromique à chaud, rincées, puis conservées dans une solution d'alcool ammoniacal ; avant leur emploi, elles étaient soigneusement essuyées avec un linge fin non pelucheux.

Une goutte du mélange était prélevée à l'aide d'une pipette Pasteur et l'étalement effectué avec l'extrémité de la pipette posée à plat sur la lame ; bactéries et cellules étaient fixées, après passage de la lame à l'étuve, par action d'un mélange alcool-éther à parties égales.

La coloration était effectuée en laissant en contact pendant 5 minutes les frottis avec la solution suivante :

fuchsin	1 g
alcool à 90°	10 g
eau distillée	90 g

le lavage ultérieur devait être fait avec beaucoup de précautions pour éviter l'entraînement des cellules levures moins adhérentes à la lame que les germes.

Après dépôt d'une goutte d'huile de cèdre, la numération était effectuée en utilisant un objectif à immersion au 1/12 et un oculaire n° 12.

R. CESAR (15), dans son travail, préconisait pour obtenir un étalement plus homogène de mélanger la goutte prélevée dans le mélange bactéries-levures avec une goutte d'un sérum quelconque ; nous avons essayé cette technique mais toujours obtenu, malgré le faible volume de la goutte de sérum ajoutée, une pellicule albumineuse qui se colorait très fortement et empêchait de voir avec netteté les cellules microbiennes beaucoup plus faiblement colorées.

L'expérience nous a montré que la propreté rigoureuse des lames était suffisante pour obtenir des étalements d'une très bonne régularité.

Résultats -

Les résultats obtenus ont été les suivants avec les diverses espèces bactériennes à l'étude.

1) Escherichia Coli

La densité optique de la suspension mère, préparée comme il a été indiqué précédemment (page 45), correspondait à 417 divisions du tambour de l'électrophotomètre de Meunier; l'étalonnage des surcharges avait donné les résultats suivants :

surcharge n° 1	166 divisions
surcharge n° 2	352 divisions

A partir de cette suspension mère, des dilutions successives dans le rapport de 1/2 furent soigneusement effectuées et à chaque fois la densité optique correspondante déterminée,

Les volumes dilués furent suffisamment grands, pour réduire au minimum l'erreur relative; (chaque dilution fut effectuée en mélangeant 5 cm³ de la suspension précédente avec 5 cm³ d'eau physiologique).

Les résultats obtenus ont été les suivants :

suspension mère d' <u>Escherichia Coli</u>	417	divisions
" au 1/2	277	"
" au 1/4	154	"
" au 1/8	80	"
" au 1/16	43	"

Une première numération fut effectuée sur la suspension mère d'Escherichia Coli diluée au 1/10, en utilisant la suspension mère de cellules levures titrée à 205.000 cellules par mm³ et non pas la suspension diluée au 1/10 qui servit à son titrage ; la suspension diluée d'Escherichia coli fut utilisée de préférence à la suspension mère, car cette dernière eut été beaucoup trop concentrée pour permettre des numérations exactes. Nous avons cependant déterminé la densité optique de cette suspension très concentrée, car elle nous permettait de préciser l'allure de la courbe d'étalonnage.

Nous donnons pour le colibacille les résultats détaillés ; en ce qui concerne les autres bactéries, l'exposé des résultats sera plus succinct.

Dans le tableau suivant les chiffres indiqués représentent, d'une part le nombre de germes, d'autre part le nombre de cellules levures par champ microscopique.

Les résultats présentés ont porté sur l'observation de 200 champs microscopiques :

Par champ microscopique

	Nombre de bactéries	Nombre de cellules levures
1er champ	17	20
2è "	14	13
3è "	18	10
4è "	16	6
5è "	15	13
6è "	16	6
7è "	41	14
8è "	21	8
9è "	22	10
10è "	<u>33</u>	<u>21</u>
Total de 10 champs	213	121

Résultats pour les autres séries de 10 champs microscopiques:

Nombre de bactéries	Nombre de cellules levures
158	109
152	73
129	65
354	150
284	143
111	68
175	88
255	118
224	81
210	107
233	110
219	90
197	94
120	74
171	92
200	109
185	106
150	87
197	88

Nous avons totalisé les nombres de bactéries et de cellules levures respectivement observées sur 200 champs microscopiques pris sur plusieurs lames en des points différents de celles-ci.

Le rapport existant entre ces nombres est le suivant :

$$\frac{\text{Nombre de bactéries}}{\text{Nombre de cellules levures}} = \frac{3.237}{1.973} = 2$$

La numération de la suspension de levures diluée au 1/10 ayant indiqué la concentration de 202.500 cellules/mm³, on en déduit que le nombre de bactéries contenu dans un mm³ de la suspension mère est de :

$$202.500 \times 2 \times 10 = 4.100.000$$

Cette concentration nous fournissait une opacité correspondant à 417 divisions du tambour de l'électrophotomètre de Meunier.

Par ailleurs, 4 numérations furent effectuées sur des suspensions de germes de plus en plus diluées.

Elles nous donnèrent les résultats suivants :

<u>Néphélémétrie</u> nombre de divisions du tambour	<u>Technique de WRIGHT</u>	
	Rapport N bactéries/N levures	Nombre de bactéries par mm ³
358	13,8	2.829.000
215	6,3	1.291.000
104	3,2	656.000
54	1,6	328.000

2) Pseudomonas aeruginosa -

Avec la technique précédemment utilisée, nous avons obtenu les résultats suivants :

- a) numération de la suspension mère microbienne diluée au 1/10, titrée par rapport à une suspension mère de cellules levures contenant 202.500 cellules par millimètre cube.

Le rapport entre le nombre de bactéries et le nombre de cellules levures pour 200 champs microscopiques fut le suivant :

$$\frac{3.414}{947} = 3,6$$

Donc le nombre de bactéries par mm³ était de :

$$202.500 \times 3,6 \times 10 = 7.290.000$$

- b) tableau des rapports entre l'opacité et le nombre de bactéries

	Nombre de divisions du tambour	Nombre de bactéries par mm ³
suspension mère	415	7.290.000
" au 1/2	278	3.645.000
" au 1/4	156	1.822.000
" au 1/8	85	911.000
" au 1/16	45	456.000

c) 3 numérations ont également été effectuées sur des suspensions microbiennes différemment diluées :

<u>Néphélémétrie</u>	Technique de WRIGHT	
Nombre de divisions du tambour	Rapport N bactéries/ N levures	Nombre de bactéries par mm ³
222	11,5	2.328.000
130	6,7	1.356.000
64	3,6	729.000

3) Staphylococcus aureus

Pour déterminer le nombre de germes contenus dans la suspension initiale, nous avons effectué la numération sur la suspension mère diluée au 1/8 et obtenu un rapport de :

$$\frac{2.526}{735} = 3,5$$

d'où le nombre de bactéries de la suspension mère par mm³ :

$$202.500 \times 8 \times 3,5 = 5.670.000$$

Après préparation des dilutions successives, les densités optiques obtenues et les nombres de bactéries correspondant ont été les suivants :

	Nombre de divisions du tambour	Nombre de bactéries par mm ³
suspension mère	457	5.670.000
" au 1/2	339	2.835.000
" au 1/4	207	1.417.000
" au 1/8	112	709.000
" au 1/16	57	355.000
" au 1/32	29,5	177.000

3 autres numérations ont donné les résultats suivants :

Néphélémétrie Nombre de divisions du tambour	Technique de WRIGHT	
	Rapport N bactéries/N levures	Nombre de bactéries par mm ³
420	19,8	4.010.000
266	10,5	2.126.000
153,5	5,6	1.134.000

4) Bacillus mesentericus ruber

La numération a été effectuée comme pour le staphylocoque sur la dilution au 1/8 de la suspension mère ; nous avons toujours effectué les numérations des suspensions bactériennes sur les dilutions au 1/8 ou au 1/10 de façon à pouvoir compter facilement tous les germes visibles dans le champ microscopique ; en opérant ainsi, nous avons augmenté l'erreur relative à la dilution mais fortement diminué celle due à la numération.

Résultat obtenu pour la numération de la suspension mère effectuée comparativement à une suspension de cellules levures contenant 185.000 cellules par mm³ :

$$185.000 \times 8 \times \frac{1.820}{2.322} = 1.160.000 \text{ bactéries par mm}^3.$$

Après dilutions successives les densités optiques obtenues et les nombres de bactéries correspondants ont été les suivants :

		Nombre de divisions du tambour	Nombre de bactéries par mm ³
suspension mère		454	1.160.000
"	au 1/2	348	580.000
"	au 1/4	228	290.000
"	au 1/8	131	145.000
"	au 1/16	73	72.500
"	au 1/32	37	36.000

Résultats obtenus sur trois autres numérations :

Néphélémétrie Nombre de divisions du tambour	Technique de WRIGHT	
	Rapport N bactéries/N levures	Nombre de bactéries par mm ³
381,5	3,9	720.000
273,5	1,7	320.000
108	4,9	90.000

La dernière numération a été effectuée par rapport à la suspension de cellules levures diluée au 1/10.

5) Klebsiella pneumoniae

Après préparation de la suspension mère et dilutions successives, nous avons obtenu, à l'électrophotomètre de Meunier, les opacités suivantes:

	Nombre de divisions du tambour
suspension mère	369
" au 1/2	199
" au 1/4	104
" au 1/8	54
" au 1/16	28
" au 1/32	14

Nous avons effectué les numérations sur les suspensions mères diluées au 1/2, au 1/4, au 1/8, au 1/16 en utilisant une suspension de cellules levures titrant 176.000 cellules levures par mm³.

Les résultats obtenus ont été les suivants :

	Néphélémétrie Nombre de divisions du tambour	Technique de WRIGHT	
		Rapport N bactéries/ N levures	Nombre de bactéries par mm ³
suspension mère	369	12	2.112.000
" au 1/2	199	6,5	1.144.000
" au 1/4	104	3,2	563.000
" au 1/8	54	1,3	229.000
" au 1/16	28	8,1 (1)	142.000

(1) Cette dernière numération fut effectuée en utilisant la suspension de cellules levures diluée au 1/10.

Nombre de bactéries par mm³, en fonction des densités optiques -

TABEAU RECAPITULATIF DES RESULTATS

<u>Escherichia coli</u>		<u>Pseudomonas aeruginosa</u>	
Nombre de divisions du tambour	Nombre de bactéries par mm ³	Nombre de divisions du tambour	Nombre de bactéries par mm ³
417	4.100.000	415	7.290.000
358	2.829.000	278	3.645.000
277	2.050.000	222	2.328.000
215	1.291.000	156	1.822.000
154	1.025.000	130	1.356.000
104	656.000	85	910.000
80	512.000	64	729.000
54	328.000	45	456.000
43	256.000		

<u>Staphylococcus aureus</u>		<u>Bacillus mesentericus ruber</u>	
Nombre de divisions du tambour	Nombre de bactéries par mm ³	Nombre de divisions du tambour	Nombre de bactéries par mm ³
457	5.670.000	454	1.160.000
420	4.010.000	381,5	720.000
339	2.835.000	348	580.000
266	2.126.000	273,5	320.000
207	1.417.000	228	290.000
153,5	1.134.000	131	145.000
112	709.000	108	90.000
57	355.000	73	72.500
29,5	177.000	37	36.000

<u>Klebsiella pneumoniae</u>	
Nombre de divisions du tambour	Nombre de bactéries par mm ³
369	2.112.000
199	1.144.000
104	563.000
54	229.000
28	142.000

Ces résultats nous ont permis d'établir les courbes suivantes : sont portés en abscisses les nombres de bactéries par mm³ de suspension bactérienne et en ordonnées le nombre de divisions du tambour de l'électrophotomètre correspondant à l'opacité de ces suspensions. (voir planches I, II, III, IV, V)

L'échelle adoptée pour représenter les nombres de bactéries par mm³ en vue de l'établissement de chacune des courbes précédentes, a été choisie la plus grande possible pour en faciliter la lecture.

Afin de pouvoir comparer plus aisément les concentrations en bactéries par mm³ des différentes suspensions microbiennes, correspondant à une même densité optique, nous avons réuni dans un seul graphique ces différentes courbes, en portant en ordonnées les logarithmes des nombres de bactéries par mm³ et en abscisses les nombres de divisions du tambour. (voir planche VI).

Calcul des logarithmes des nombres de bactéries par mm³

<u>Staphylococcus aureus</u>		
Nombre de divisions du tambour	Nombre de bactéries par mm ³	Log.
457	5.670.000	6,75
420	4.020.000	6,60
339	2.835.000	6,45
266	2.126.000	6,33
207	1.417.000	6,15
153,5	1.134.000	6,05
112	709.000	5,85
57	355.000	5,55
29,5	177.000	5,25

<u>Escherichia coli</u>		
Nombre de divisions du tambour	Nombre de bactéries par mm ³	Log.
417	4.100.000	6,61
358	2.829.000	6,45
277	2.050.000	6,30
215	1.291.000	6,11
154	1.025.000	6,01
104	656.000	5,81
80	512.000	5,71
54	328.000	5,51
43	256.000	5,41

<u>Pseudomonas aeruginosa</u>		
Nombre de divisions du tambour	Nombre de bactéries par mm ³	Log.
415	7.290.000	6,86
278	3.645.000	6,56
222	2.328.000	6,37
156	1.822.000	6,26
130	1.356.000	6,13
85	911.000	5,96
64	729.000	5,86
45	456.000	5,66

<u>Klebsiella pneumoniae</u>		
Nombre de divisions du tambour	Nombre de bactéries par mm ³	Log.
369	2.112.000	6,32
199	1.114.000	6,06
104	563.000	5,75
54	229.000	5,36
28	142.000	5,15

Bacillus mesentericus ruber

Nombre de divisions du tambour	Nombre de bactéries par mm ³	Log.
454	1.160.000	6,06
381,5	720.000	5,86
348	580.000	5,76
273,5	320.000	5,50
228	290.000	5,46
131	145.000	5,16
108	90.000	4,95
73	72.500	4,86
37	36.000	4,56

B - ESSAIS DE PHAGOCYTOSE

Pour les essais quantitatifs que nous avons effectués sur le phénomène de phagocytose, nous avons opéré in vitro de façon à toujours pouvoir contrôler quantitativement les différents facteurs. En opérant in vivo les quantités de bactéries, de leucocytes, de produits bactériostatiques injectés sont beaucoup plus difficiles à contrôler et rendent plus difficile l'interprétation de résultats quantitatifs.

Par ailleurs, le nombre de produits mis en expérience, les différentes doses utilisées pour chaque produit, auraient exigé un nombre assez considérable d'animaux qu'il nous était difficile de réunir ; d'autre part, ces essais eussent été impossibles avec certaines substances antiseptiques utilisées au cours de nos expériences, telles le chlorure mercurique, le phénol.

Pour effectuer nos expériences, nous avons repris la technique de WRIGHT qui nous a semblé être celle introduisant le moins de causes d'erreur et s'adaptant le mieux à la technique utilisée.

I - TECHNIQUE

a) Obtention des suspensions microbiennes

Ayant préalablement déterminé les doses antigénétiques (bactériostatiques) des différentes substances en essai, sur les différentes bactéries mises en expérience, nous avons fait agir in vitro ces substances dans les

mêmes conditions, à doses décroissantes (inférieures aux doses antigénétiques), sur les différentes bactéries cultivées en bouillon.

Nous avons ainsi obtenu dans tous les tubes, après 24 heures d'incubation à 37° C, des cultures plus ou moins abondantes, dont les éléments différaient comme nous le verrons ultérieurement, tant au point de vue morphologique qu'au point de vue tinctorial, des germes obtenus par culture sur gélose inclinée pendant 24 heures.

Les cultures étaient d'autant plus abondantes que la dose de substance antiseptique ajoutée dans les tubes était plus faible.

Après 24 heures d'incubation à 37°C, le contenu des différents tubes était transvasé du tube à essai ordinaire où avait eu lieu la culture dans un tube à hémolyse en verre épais et centrifugé pendant 30 minutes, de façon à obtenir un culot microbien surmonté d'un liquide parfaitement clair ; dans l'ensemble, une centrifugation de 30 minutes à 3.600 tours/minute suffisait ; dans les cas contraires, nous avons augmenté le temps de centrifugation sans augmenter la vitesse.

Par simple retournement du tube, le bouillon surnageant était éliminé et remplacé par son volume d'eau physiologique ; à l'aide d'une pipette Pasteur fermée, le culot microbien adhérant au fond du tube était alors remis en suspension aussi homogène que possible ; deux lavages étaient ainsi opérés afin d'éliminer les quantités de substance antiseptique ou antibiotique présentes dans le bouillon de culture ainsi que toute trace de peptone, cette dernière possédant un pouvoir très net sur le tactisme leucocytaire, même à dose très faible.

Après le second lavage, le culot plus ou moins important que nous obtenions était repris par une quantité d'eau physiologique telle que la concentration en bactéries fut de 200 millions de bactéries par cm³ (200.000 par mm³). Avec un peu d'expérience, nous arrivions à réaliser des suspensions légèrement plus concentrées dont nous mesurons l'opacité à ce moment à l'électrophotomètre de Meunier. L'opacité de ces suspensions était toujours relativement assez faible et quand nous nous reportions aux courbes d'étalonnage, nous constatons que le point obtenu se situait toujours dans la première partie de la courbe qui pratiquement peut être considéré comme une droite.

De ce fait, la concentration en bactéries étant proportionnelle à l'opacité des suspensions, un calcul très simple nous indiquait la quantité d'eau physiologique à y ajouter pour obtenir la suspension de titre désiré.

b) Obtention des leucocytes

Nous avons adopté pour l'obtention des leucocytes, c'est-à-dire pratiquement celle des polynucléaires, la technique mise au point par A. DELAUNAY (23) :

Plusieurs cobayes au repos et bien nourris depuis la veille,

reçoivent le matin une injection intrapéritonéale de 6 cm³ de bouillon nutritif stérile ; 3 heures après, une seconde injection de 4 cm³ du même produit est effectuée ; 2 heures après la seconde injection, la réaction inflammatoire est particulièrement nette.

L'organisme de l'animal réagit à l'injection de ce produit étranger par un afflux de leucocytes constitué uniquement ou presque par des polynucléaires. Pour prélever le liquide péritonéal riche en polynucléaires, la technique est la suivante : le ventre de l'animal est rasé et désinfecté à l'alcool à 90° ; une boutonnière est faite dans la peau et le prélèvement s'effectue simplement en perforant le péritoine de l'animal à l'aide d'une pipette Pasteur ; la pointe de la pipette ne doit pas être en verre trop fin, afin d'éviter qu'elle ne se casse au moment de la ponction et son extrémité doit être taillée en biseau de façon à permettre une perforation facile du péritoine.

L'animal est tenu par un aide de façon à ce que la peau du ventre soit tendue ; l'extrémité de la pipette est introduite dans la boutonnière et le péritoine perforé ; à ce moment, le liquide péritonéal blanc laiteux monte par capillarité dans la pipette ; celle-ci est inclinée à 30° sur l'horizontale ; le liquide monte assez rapidement et il est fréquent d'obtenir 10 à 20 cm³ de liquide péritonéal par cobaye : parfois du sang est aspiré dans la pipette ; il est alors préférable de faire un nouveau prélèvement sur l'autre flanc de l'animal de façon à éviter la présence d'hématies ; il arrive parfois qu'un caillot obture l'extrémité de la pipette ; un léger déplacement de celle-ci suivant son axe permet à nouveau l'ascension du liquide péritonéal.

Si la réaction inflammatoire relativement faible ne permet d'obtenir que peu de liquide un léger massage du ventre de l'animal permet parfois de gagner quelques cm³ si cela est nécessaire ; après le prélèvement la plaie est nettoyée et l'animal remis dans sa cage ; une quinzaine de jours après, parfois moins, la plaie est cicatrisée et l'animal peut resservir après un mois.

Après ascension aussi complète que possible de l'exsudat péritonéal dans la pipette Pasteur, celui-ci est rejeté dans un verre à pied préalablement placé à l'étuve à 37° C de façon à ce que les leucocytes ne se trouvent pas en contact avec une paroi froide, le froid étant un des principaux facteurs d'inhibition du tactisme leucocytaire.

Pour obtenir des exsudats péritonéaux en quantité suffisante, présentant des concentrations en leucocytes élevées, il faut utiliser des cobayes pesant au minimum 300 g ; au début de nos essais, nous avons utilisé des cobayes pesant 250 g, parfois moins ; nous avons eu alors d'assez nombreux échecs surtout en ce qui concerne la quantité d'exsudat recueilli ; par ailleurs, les animaux relativement gros résistent beaucoup mieux que les petits à la ponction péritonéale.

c) Phagocytose

Tous les éléments de l'expérience étant ainsi réunis, nous

pouvions procéder aux essais de phagocytose proprement dits : dans de petits tubes à hémolyse soigneusement lavés, séchés et portés 1 heure à l'étuve à 37° C, étaient ajoutées des quantités égales (0,5 cm³)

a - d'émulsion bactérienne titrant 200 millions de bactéries par cm³,

b - d'exsudat péritonéal frais de façon à ce que :

1°) les facteurs contenus dans le liquide péritonéal et influençant la phagocytose (à savoir le complément et les ions calcium), se trouvent toujours dilués dans le même rapport de 1/2.

2°) le rapport "nombre de bactéries sur nombre de leucocytes" reste, lui aussi, constant.

Les tubes à hémolyse sont portés à l'étuve à 37°C où ils sont maintenus 1/2 heure. Après ce temps, on constate la présence au fond du tube d'un sédiment, tandis que le mélange des deux suspensions, trouble à l'origine, est pratiquement limpide. Le sédiment adhère au fond du tube mais faiblement ; après décantation soignée du liquide surnageant, le sédiment est prélevé sur un petit tampon de coton fixé sur une tige métallique et étalé sur une lame de verre parfaitement propre, ce qui permet un étalement régulier.

Nous avons d'abord essayé de pratiquer l'étalement à l'aide d'une pipette Pasteur mais cette technique nous conduisit à constater l'altération plus ou moins prononcée des leucocytes. Les étalements sont séchés et fixés légèrement.

Coloration

Nous avons essayé comparativement plusieurs colorants tels :

le Bleu de Loeffler
le Bleu de méthylène
le Fuchsine de Ziehl diluée au 1/4 ou au 1/20.

Nous avons constaté que la coloration avec une solution de Bleu de méthylène préparée selon la formule suivante :

Bleu de méthylène.....	1 g
Alcool à 90°.....	20 cm ³
Acide acétique.....	50 cm ³
Eau distillée.....	950 cm ³

était excellente, pour le staphylocoque et le bacille mesentericus. Pour la coloration des lames du colibacille, du bacille pyocyanique et du pneumobacille, nous avons préféré, pour la facilité de la lecture des lames, la fuchsine au 1/10.

L'idéal est d'obtenir une très bonne coloration des bactéries et une coloration relativement faible des polymorphes, de façon à ce que

les bactéries phagocytées apparaissent plus distinctement.

Le temps de contact a été fixé à 2 minutes avec le bleu de méthylène ; avec la fuchsine diluée au 1/10, 30 secondes suffisaient.

2 - DETERMINATION DE L'INDEX PHAGOCYTAIRE

Nous avons établi l'échelle des différentes doses des produits antiseptiques ou antibiotiques à mettre en expérience en tenant compte de la dose antigénétique déterminée au cours des essais précédents ; nous avons, selon les cas, établi des gammes de 5 à 6 tubes de culture (bouillon) ; dans le dernier tube de la gamme était introduite une dose égale ou très voisine de la dose antigénétique, de façon à pouvoir contrôler celle-ci ; dans les tubes précédents, étaient introduites des doses décroissantes.

Dans le premier tube, tube témoin, n'étaient introduits que les germes et l'eau distillée stérile. La phagocytose des bactéries qui s'étaient développées dans ce tube, permettait de constater si la phagocytose des bactéries cultivées en présence d'antiseptiques était supérieure et dans quelle proportion.

Nous exposerons en détail le protocole des expériences que nous avons effectuées en étudiant l'action de l'iode sur les différentes espèces microbiennes mises en expérience.

Nous exposerons plus succinctement les résultats obtenus au cours des essais effectués à l'aide des autres substances antiseptiques ou antibiotiques.

Exposé des essais portant sur l'action de l'Iode :

Staphylococcus aureus

	Tubes N°					
	T	1	2	3	4	5
Bouillon double(en cm³)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Suspension microbienne "	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Sol.iodo-iodurée à 1 g 25 pour 1000	-	0.04	0.20	0.40	0.80	1.40
Eau distillée stérile (en cm³)	2.25	2.21	2.05	1.85	1.45	0.85
Concentration finale en g pour mille	0	0.01	0.05	0.10	0.20	0.35
Lecture après 24 heures	+	+	+	+	+	-

Le signe + indique une culture positive, le signe - une culture négative.

Escherichia coli

	Tubes N°					
	T	1	2	3	4	5
Bouillon double (en cm3)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Suspension microbienne "	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Sol. iodo-iodurée à 2 g 5 pour mille	-	0.10	0.30	0.60	0.80	1
Eau distillée stérile (en cm3)	2.25	2.15	1.95	1.65	1.45	1.25
Concentration finale en g pour mille	0	0.05	0.15	0.30	0.40	0.50
Lecture après 24 heures	+	+	+	+	±	-

Pseudomonas aeruginosa

	Tubes N°					
	T	1	2	3	4	5
Bouillon double (en cm3)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Suspension microbienne (en cm3)	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Sol.iodo-iodurée à 1 g 25 pour mille	-	0.04	0.20	0.40	0.80	1.40
Eau distillée stérile (en cm3)	2.25	2.20	2.05	1.85	1.45	0.85
Concentration finale en g pour mille	0	0.01	0.05	0.10	0.20	0.35
Lecture après 24 heures	+	+	+	+	+	-

Klebsiella pneumoniae

	Tubes N°					
	T	1	2	3	4	5
Bouillon double (en cm ³)	2,5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Suspension microbienne "	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Sol.iodo iodurée à 1 g pour mille	-	0.05	0.25	0.50	1	1.50
Eau distillée stérile (en cm ³)	2.25	2.20	2	1.75	1.25	0.75
Concentration finale en g pour mille	0	0.01	0.05	0.10	0.20	0.30
Lecture après 24 heures	+	+	+	+	+	-

Bacillus mesentericus ruber

	Tubes N°					
	T	1	2	3	4	5
Bouillon double (en cm ³)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Suspension microbienne "	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Sol.iodo-iodurée à 1 g pour mille	-	0.05	0.25	0.50	1	1.50
Eau distillée stérile (en cm ³)	2.25	2.20	2.	1.75	1.25	0.75
Concentration finale en g pour mille	0	0.01	0.05	0.10	0.20	0.30
Lecture après 24 heures	+	+	+	+	+	-

Après préparation et mélange des suspensions microbienne et leucocytaire selon la technique précédemment exposée, nous avons préparé à partir du contenu de chacun des tubes à hémolyse où avait eu lieu le contact entre bactéries et leucocytes plusieurs étalements et effectué les différentes numérations en examinant toutes les lames ainsi préparées.

Ces numérations nous ont permis d'établir la valeur de l'index phagocytaire, c'est-à-dire le nombre moyen des bactéries englobées par leucocyte.

Résultats

Pour simplifier l'exposé des résultats, nous avons adopté la notation suivante :

Les lames portant les différentes espèces bactériennes : Staphylocoque, Colibacille, Bacille pyocyannique, Bacille mesentericus, Pneumobacille, ont été respectivement marquées :

S - C - P - M - Pn.

Les lames préparées à partir des tubes témoins portent la lettre seule.

Les autres lames préparées à partir des tubes de la gamme, portent les indices : 1, 2, 3, etc... correspondant aux doses croissantes de substances antiseptiques ou antibiotiques. Par exemple : si l'on considère le tableau précédent se rapportant à l'action des doses croissantes de la solution iodo iodurée sur Staphylococcus aureus, les lames correspondant au tube n° 1 (concentration égale à 0.01 g pour mille) seront marquées S1, les lames correspondant au tube n°2 (concentration égale à 0,05 g pour mille) seront marquées S2 et ainsi de suite.

Les numérations ont été effectuées sur le plus grand nombre possible de cellules phagocytaires, de façon à diminuer autant que possible l'erreur relative ; nous avons toujours compté au moins 100 éléments phagocytaires, souvent 200.

Numération des staphylocoques phagocytés (essai avec l'Iode)

	Nombre de leucocytes	Nombre de bactéries	Nombre de leucocytes	Nombre de bactéries	Nombre de leucocytes	Nombre de bactéries
S 1	5	44	1	13	5	38
	6	16	5	62	8	32
	4	32	4	28	4	32
	5	12	3	5	9	57
	7	27	9	57	6	34
	2	17	4	28	7	41
	6	10	7	35	5	26
	7	20	7	41	6	12
	5	28	5	25		
	3	12	5	15		
Totaux	50	218	50	309	50	262

soit, au total : 150 leucocytes

ayant englobé $218 + 309 + 262 = 789$ bactéries ce qui donne un rapport de :

$$\frac{789}{150} = 5,26 \text{ bactéries par leucocyte.}$$

Les numérations effectuées sur les lames S2, S3, S4 et S (lame témoin) donnent respectivement les rapports suivants :

S 2 :	997/150	=	6,38
S 3 :	1.226/150	=	8,18
S 4 :	1.470/150	=	9,80
S :	690/150	=	4,6

Tableau récapitulatif

	Concentration en Iode en g pour mille.	Index phagocytaire
S	0	4,6
S 1	0,01	5,26
S 2	0,05	6,38
S 3	0,10	8,18
S 4	0,20	9,80

Dose antigénétique: 0,32 g par litre.

Nous résumerons sous forme de tableau les résultats obtenus au cours des autres essais :

Action de l'Iode sur :

Colibacille

	Concentration en Iode en g pour mille	Index phagocytaire
C	0	0,46
C 1	0,05	0,85
C 2	0,15	0,82
C 3	0,30	1

Dose antigénétique : 0,52 g par litre.

Bacille pyocyannique

	Concentration en Iode en g pour mille	Index phagocytaire
P	0	0,32
P 1	0,01	0,26
P 2	0,05	0,58
P 3	0,10	0,83
P 4	0,20	1,05

Dose antigénétique : 0,32 g par litre.

Pneumobacille

	Concentration en Iode en g pour mille	Index phagocytaire
Pn	0	0,30
Pn 1	0,01	0,25
Pn 2	0,05	0,30
Pn 3	0,10	0,16
Pn 4	0,20	0,24

Dose antigénétique : 0,30 g par litre.

Bacille mesentericus ruber

Pour ce germe, nous avons essayé d'utiliser la même technique, mais nous nous sommes heurtés à l'impossibilité de dissocier complètement le voile qui s'était développé à la surface des cultures ; aussi, avons-nous, en ce qui concerne l'étude de la phagocytose du Bacille mesentericus, adopté une lecture relative, sans effectuer de numération qui aurait été fatalement erronée.

La notation suivante a été adoptée :

- : ni accollement, ni phagocytose
- ± : accollement sans phagocytose
- + : phagocytose très légère
- ++ : phagocytose relativement nette, peu élevée
- +++ : phagocytose nette, relativement élevée
- ++++ : phagocytose très active.

Résultats obtenus avec l'Iode :

	Concentration en Iode en g pour mille	Intensité de la phagocytose
M	0	+ / ++
M 1	0.01	+
M 2	0.05	+ / ++
M 3	0.10	++

Dose antigénétique : 0,30 g par litre.

Résultats obtenus après action du PHÉNOL :

Staphylocoque

	Concentration en Phénol en g pour mille	Index phagocytaire
S	0	4,6
S 1	0,01	6
S 2	0,05	7,6
S 3	0,10	8,1
S 4	0,50	9,9
S 5	1	12,5

Dose antigénétique : 2,12 g par litre.

Colibacille

	Concentration en Phénol en g pour mille	Index phagocytaire
C	0	0,46
C 1	0,01	1,18
C 2	0,05	1,24
C 3	0,10	1,40
C 4	0,50	1,28

Dose antigénétique : 1,75 g par litre.

Dans le tube C 5, dans lequel la concentration en phénol était égale à 1,50 g pour mille, la poussée microbienne n'a pas été suffisante pour permettre l'exécution de la technique.

Bacille pyocyanique

	Concentration en Phénol en g pour mille	Index phagocytaire
P	0	0,32
P 1	0,01	0,74
P 2	0,05	0,94
P 3	0,10	1,34
P 4	0,50	1,16
P 5	1	

Dose antigénétique : 1,16 g par litre.

La poussée microbienne a été insuffisante dans le tube P 5 pour la détermination de l'index phagocytaire.

Pneumobacille

	Concentration en Phénol en g pour mille	Index phagocytaire
Pn	0	0,30
Pn 1	0,01	0,20
Pn 2	0,05	0,32
Pn 3	0,10	0,23
Pn 4	0,50	1,16
Pn 5	1	

Dose antigénétique : 1,10 g par litre.

Bacille mesentericus

	Concentration en Phénol en g pour mille	Intensité de la phagocytose
M	0	+ / + +
M 1	0,01	+
M 2	0,05	+
M 3	0,10	+ / + +
M 4	0,50	+ +
M 5	1	+ +

Dose antigénétique : 1,10 g par litre.

Résultats obtenus après action du CHLORURE MERCURIQUE :

Staphylocoque

	Concentration en Cl ₂ Hg en mg pour mille	Index phagocytaire
S	0	4,6
S 1	0,01	5,6
S 2	0,05	6,45
S 3	0,10	8
S 4	0,50	9
S 5	1	

Dose antigénétique : 3 milligrammes
par litre.

(poussée microbienne insuffisante en S 5).

Colibacille

	Concentration en Cl ₂ Hg en mg pour mille	Index phagocytaire
C	0	0,46
C 1	0,05	0,5
C 2	0,10	0,85
C 3	0,50	0,80
C 4	1	1,20

Dose antigénétique : 4 milligrammes par litre.

Bacille pyocyanique

	Concentration en Cl ₂ Hg en mg pour mille	Index phagocytaire
P	0	0,32
P 1	0,05	1,5
P 2	0,10	2,25
P 3	0,50	2,90
P 4	1	

Dose antigénétique : 2 milligrammes par litre.

(poussée microbienne insuffisante dans le tube 4).

Pneumobacille

	Concentration en Cl ₂ Hg en mg pour mille	Index phagocytaire
Pn	0	0,30
Pn 1	0,05	0,21
Pn 2	0,10	0,32
Pn 3	0,50	0,29
Pn 4	1	0,40

Dose antigénétique : 2 milligrammes par litre.

Bacille mesentericus

	Concentration en Cl ₂ Hg en mg pour mille	Intensité de la phagocytose
M	0	+ / + +
M 1	0,05	+
M 2	0,10	+
M 3	0,50	+ +
M 4	1	+ +

Dose antigénétique : 3 milligrammes par litre.

Résultats obtenus après action de la PENICILLINE :

Staphylocoque

	U.O. par cm ³	Index phagocytaire
S	0	4,6
S 1	0,001	4,98
S 2	0,002	4,64
S 3	0,01	6,8
S 4	0,04	9,10

Dose antigénétique: 0,05 U.O. par cm³

Colibacille

	U.O. par cm ³	Index phagocytaire
C	0	0,46
C 1	1	0,78
C 2	4	0,75
C 3	10	1,10
C 4	20	1,45
C 5	40	1,10

Dose antigénétique : 60 U.O. par cm³

Bacille pyocyanique

	U.O. par cm ³	Index phagocytaire
P	0	0,32
P 1	200	0,44
P 2	1.000	0,56
P 3	2.000	0,96
P 4	5.000	

Dose antigénétique: 10.000 U.O. par cm³

L'altération des germes contenus dans le tube 4 n'a pas permis d'effectuer une numération exacte.

Pneumobacille

	U.O. par cm ³	Index phagocytaire
Pn	0	0,30
Pn 1	0,1	0,40
Pn 2	0,2	0,36
Pn 3	1	0,64
Pn 4	5	

Dose antigénétique: 8 U.O. par cm³

La détermination de l'index phagocytaire n'a pu être effectuée pour la même raison que précédemment.

Bacille mesentericus

	U.O. par cm ³	Intensité de la phagocytose
M	0	+ / + +
M 1	0,02	+
M 2	0,10	+ / + +
M 3	0,20	+ +
M 4	1	+

Dose antigénétique: 3 U.O. par cm³

Résultats obtenus après action de la STREPTOMYCINE :

Staphylocoque

	✓ par cm ³	Index phagocytaire
S	0	4,6
S 1	0,2	5,84
S 2	1	10,32
S 3	2	9,88
S 4	5	11,56

Dose antigénétique: 15 ✓ par cm³

Colibacille

	✓ par cm ³	Index phagocytaire
C	0	0,46
C 1	0,4	0,76
C 2	2	0,84
C 3	4	1,06
C 4	10	0,65

Dose antigénétique: 25 ✓ par cm³

Bacille pyocyannique

	† par cm ³	Index phagocytaire
P	0	0,32
P 1	0,4	0,40
P 2	2	0,36
P 3	4	1,10
P 4	10	0,82

Dose antigénétique: 15 X par cm³

Pneumobacille

	γ par cm ³	Index phagocytaire
Pn	0	0,30
Pn 1	0,04	0,50
Pn 2	0,08	0,54
Pn 3	0,32	0,36
Pn 4	0,8	0,70

Dose antigénétique : 2 γ par cm³

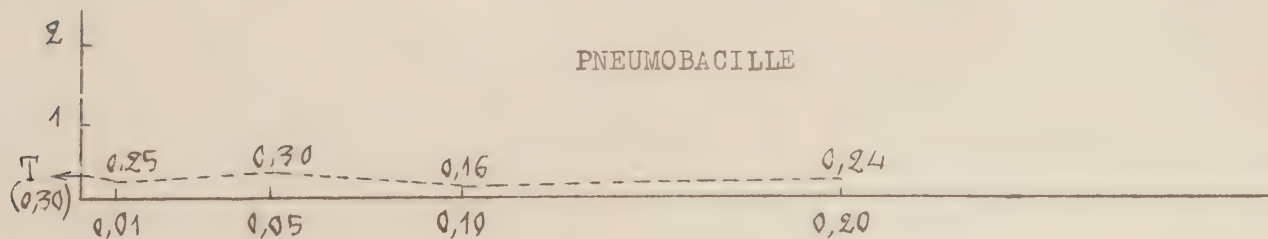
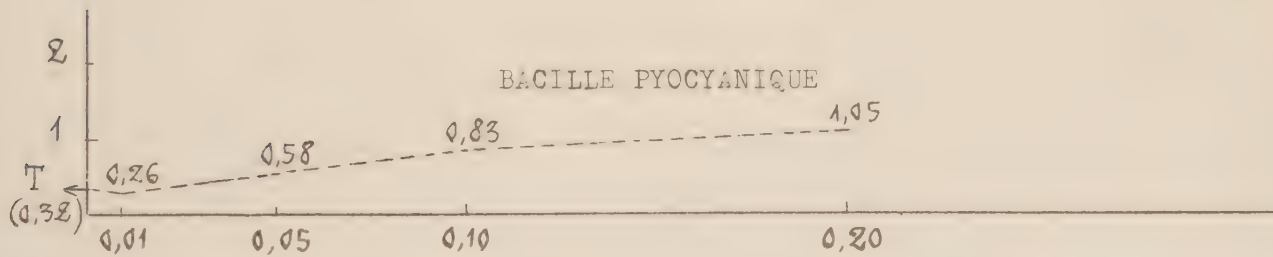
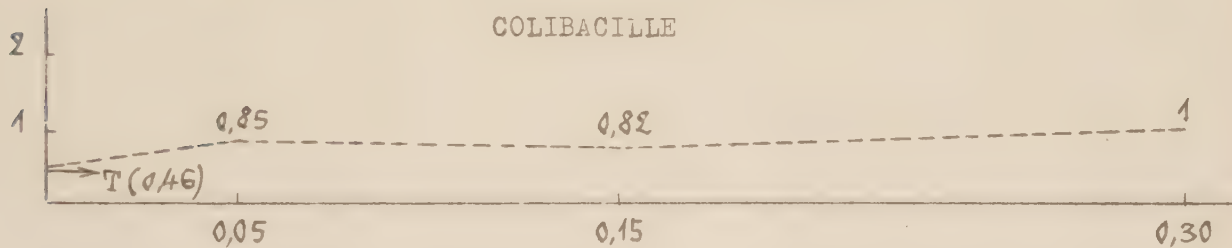
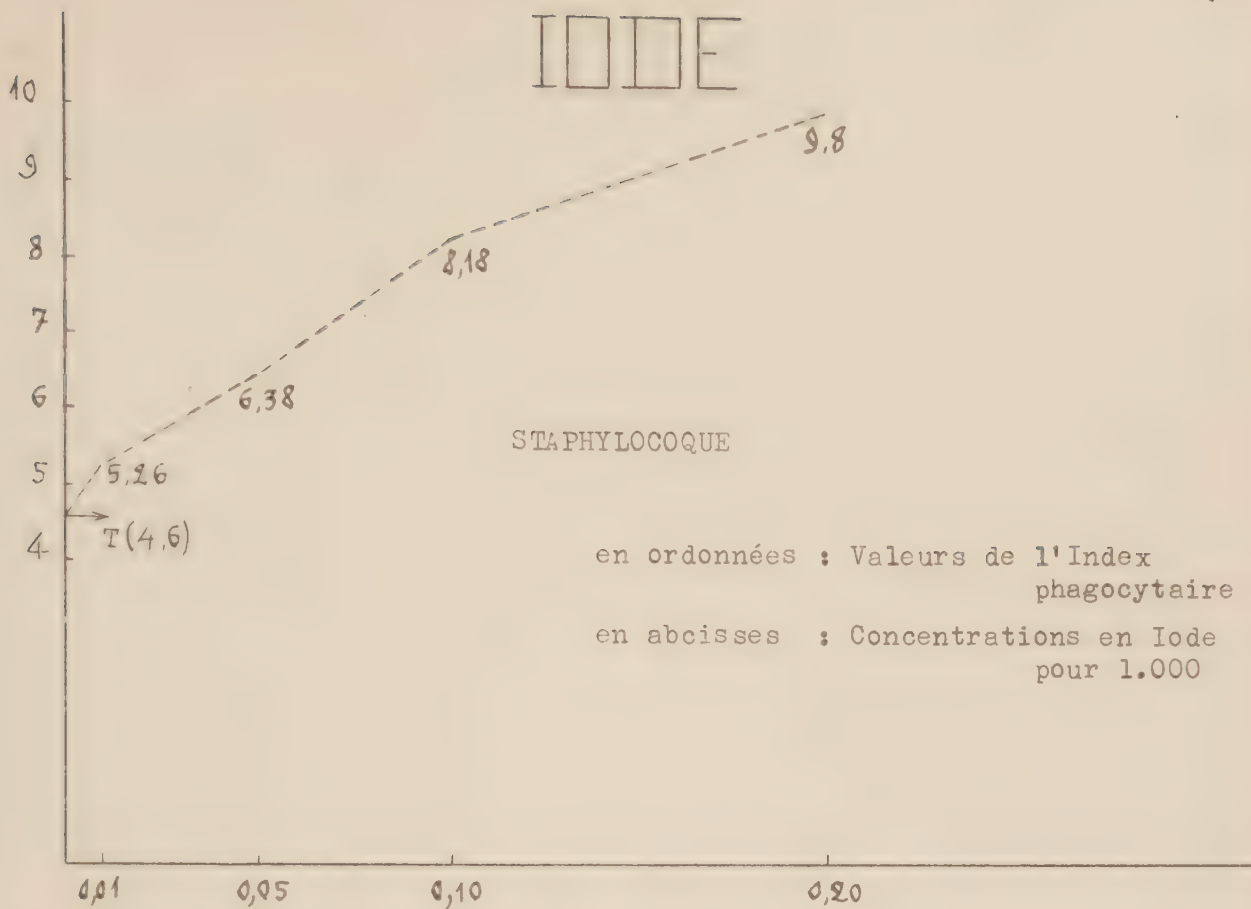
Bacille mesentericus

	γ par cm ³	Intensité de la phagocytose
M	0	+ / + +
M 1	0,01	+
M 2	0,05	+ / + +
M 3	0,15	+ +
M 4	0,4	+

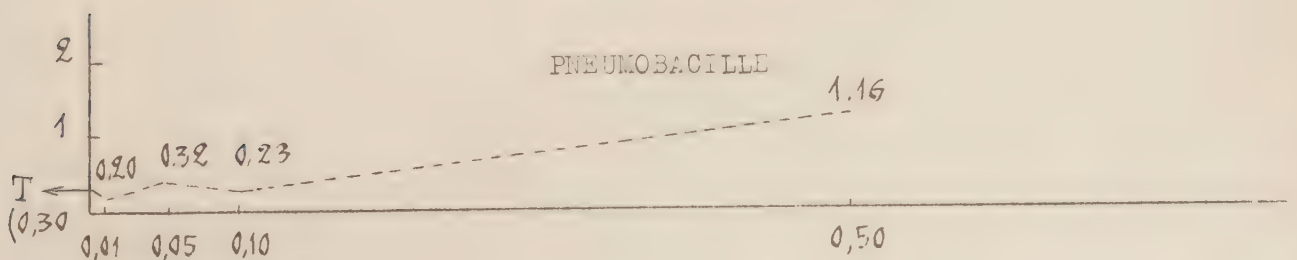
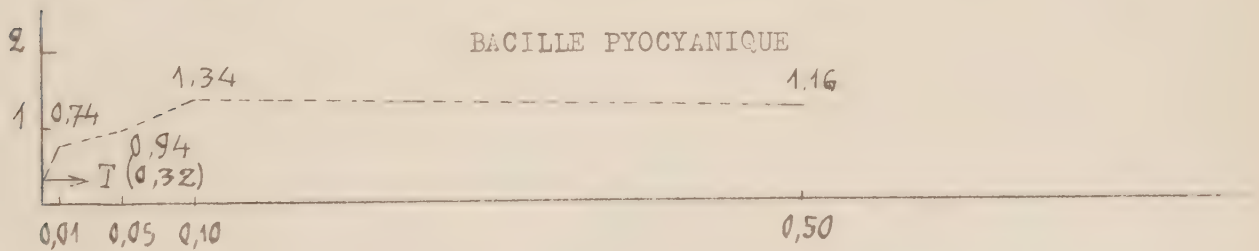
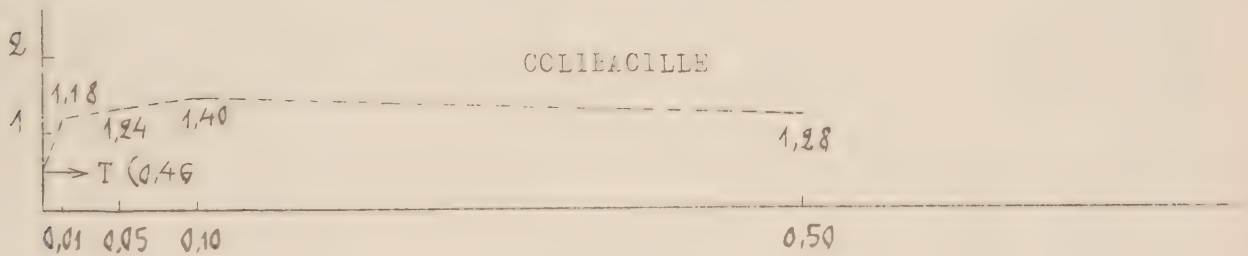
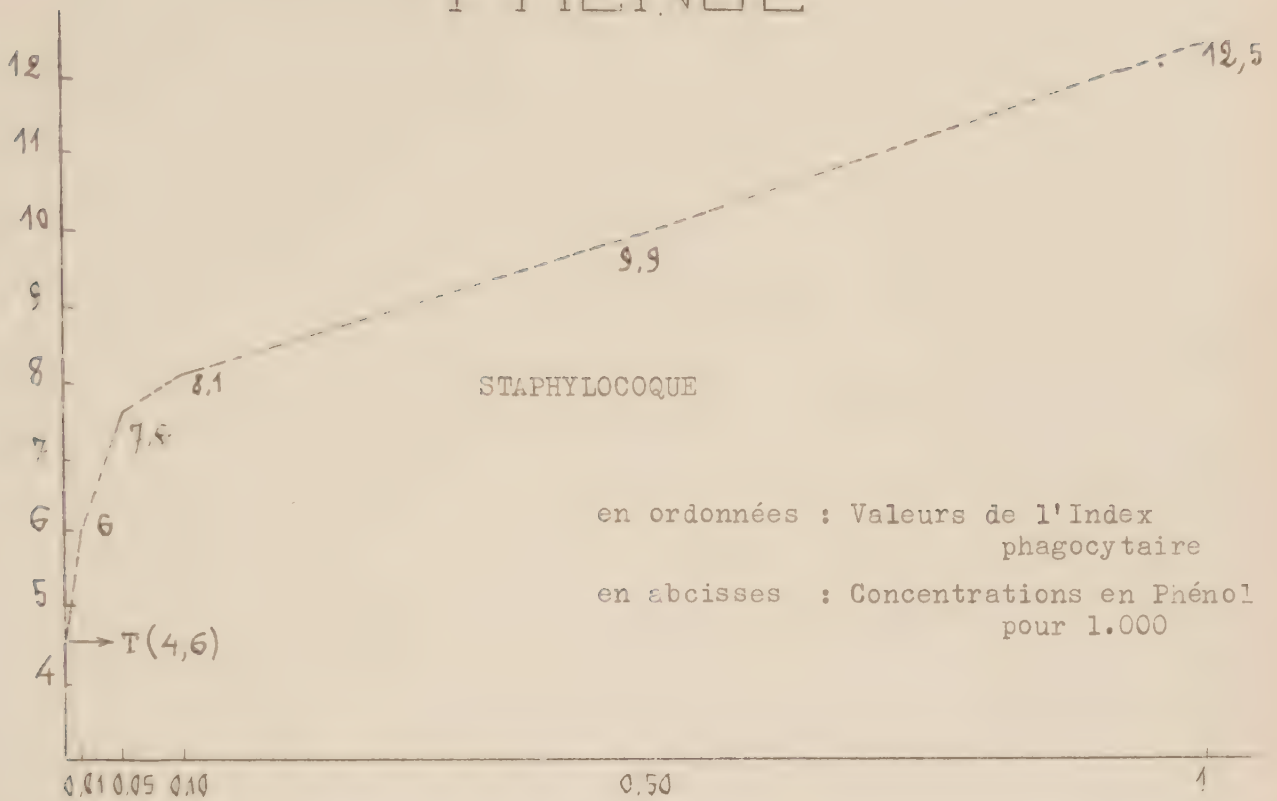
Dose antigénétique: 0,08 γ par cm³

Afin de rendre plus clairs ces différents résultats, nous avons établi une série de courbes en portant en abscisses les doses croissantes d'antiseptiques ou d'antibiotiques avec lesquelles les différents germes avaient été mis en contact avant d'être soumis à l'action phagocytaire des leucocytes ; en ordonnées sont portées les valeurs de l'index phagocytaire, c'est-à-dire le nombre moyen de germes englobés par leucocytes.

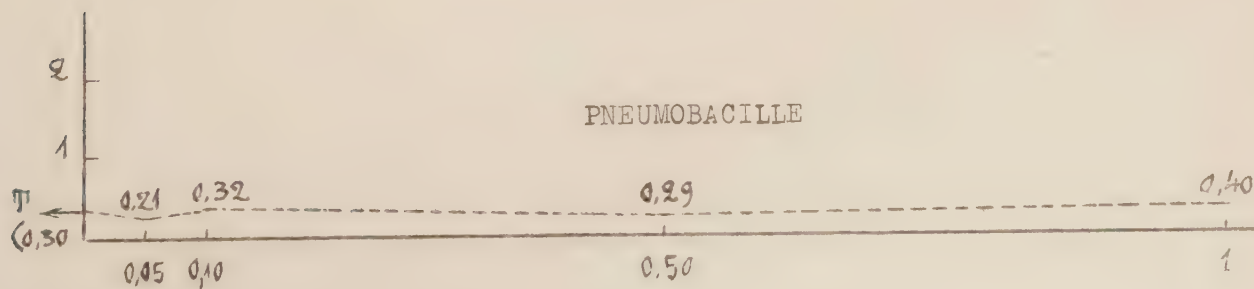
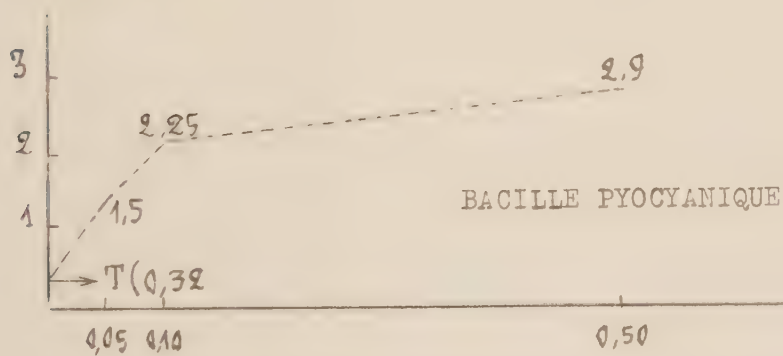
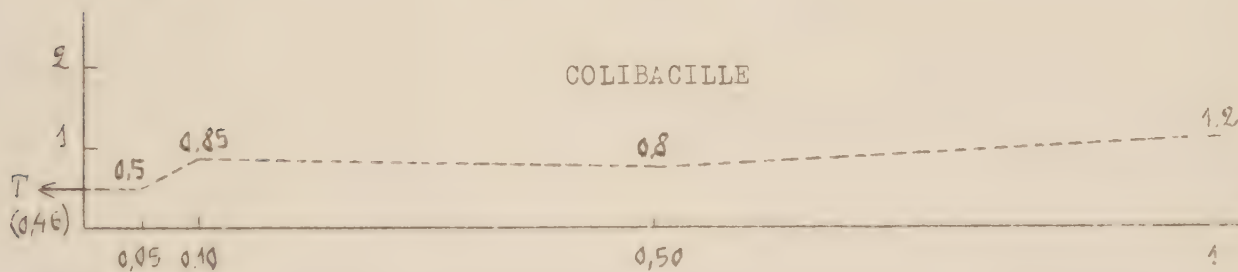
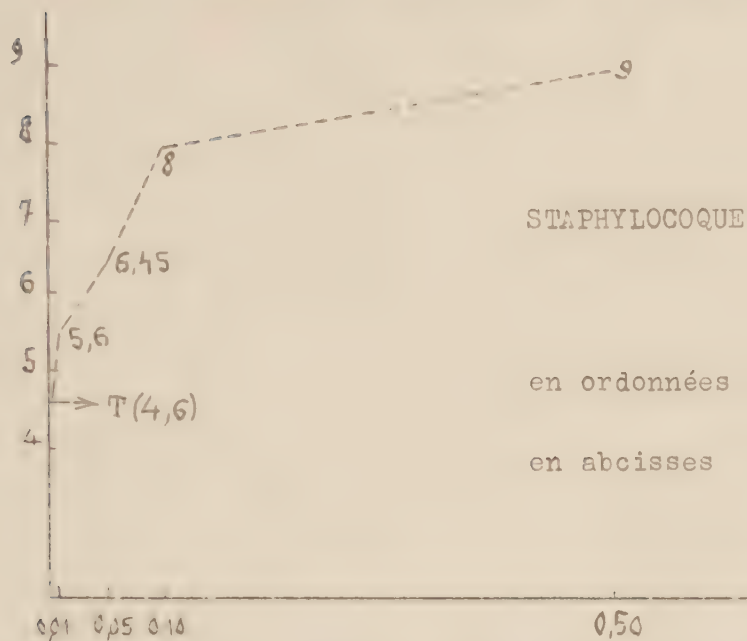
IODE



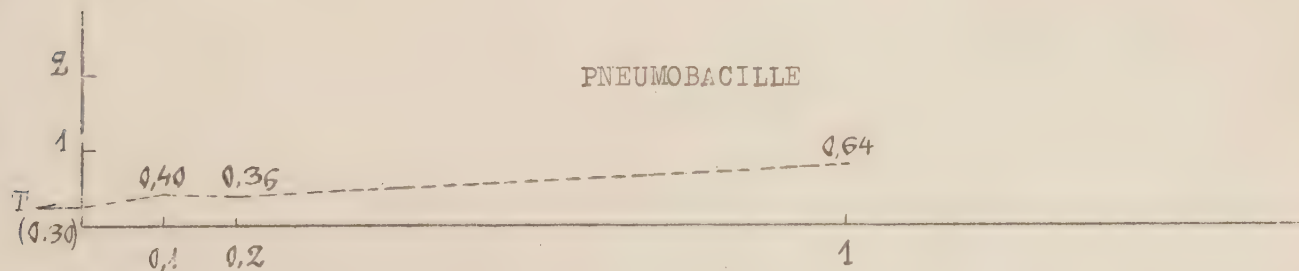
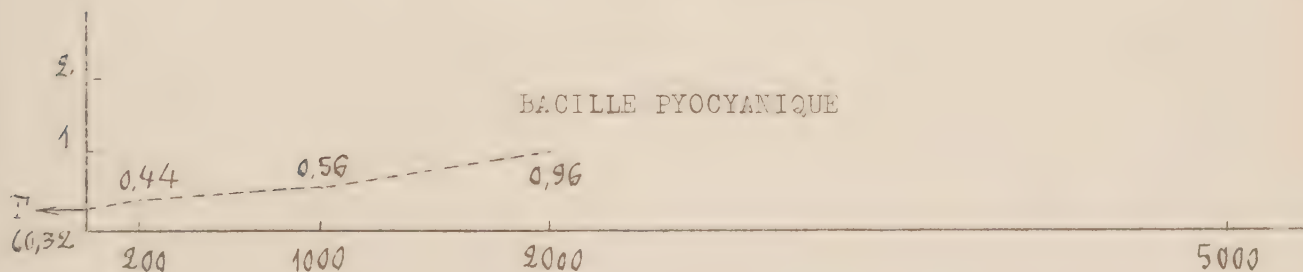
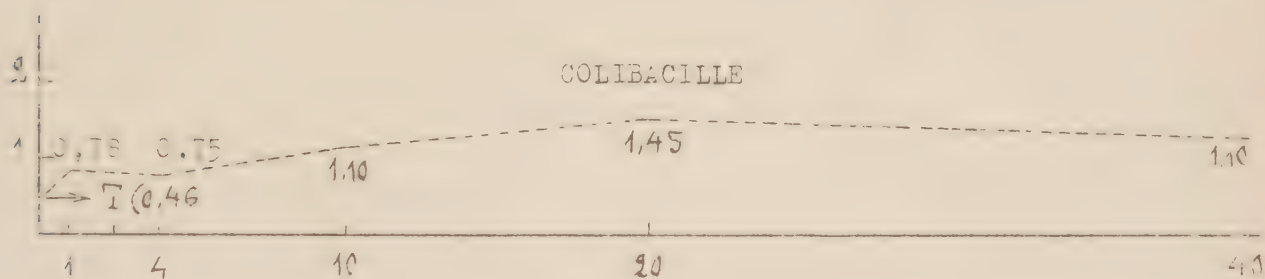
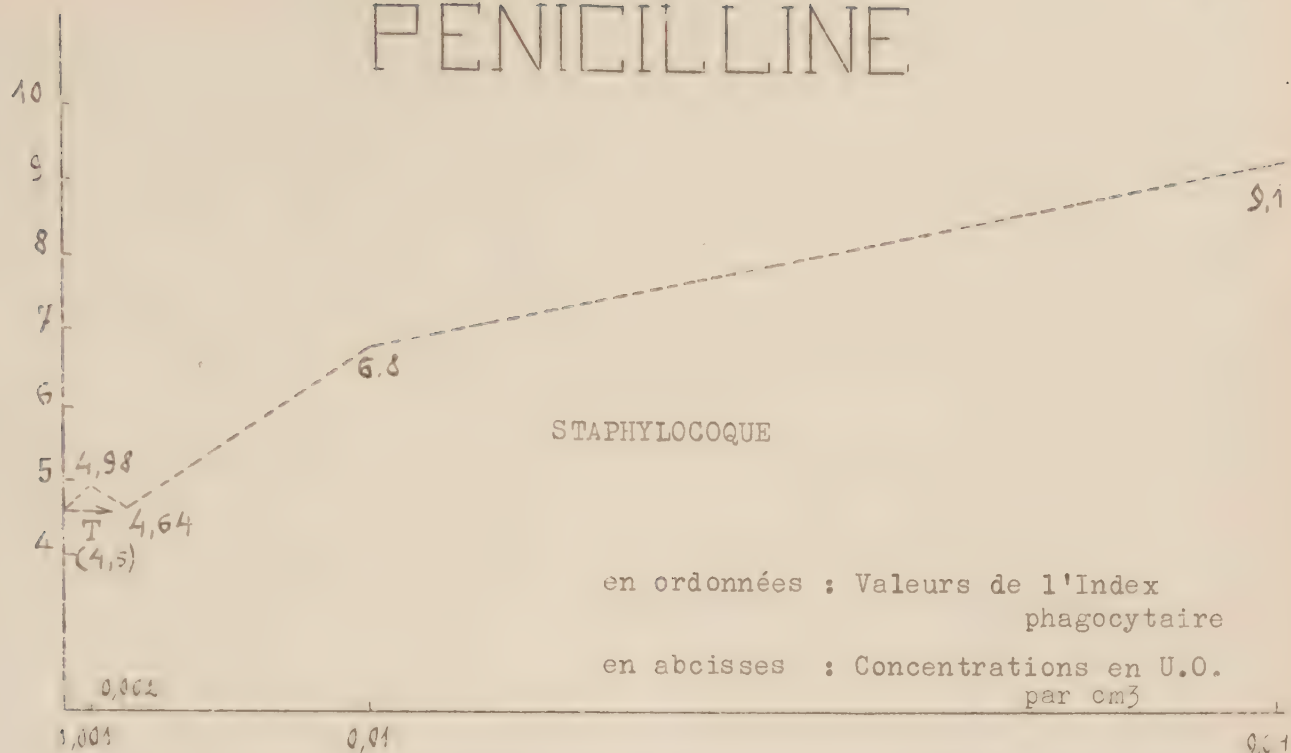
PHENOL



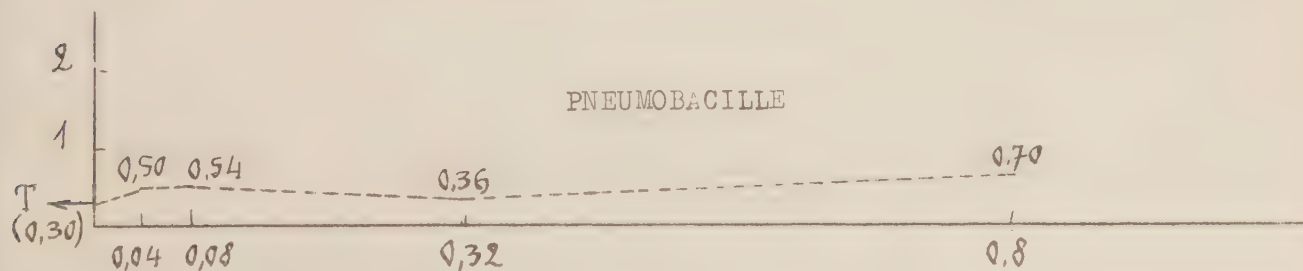
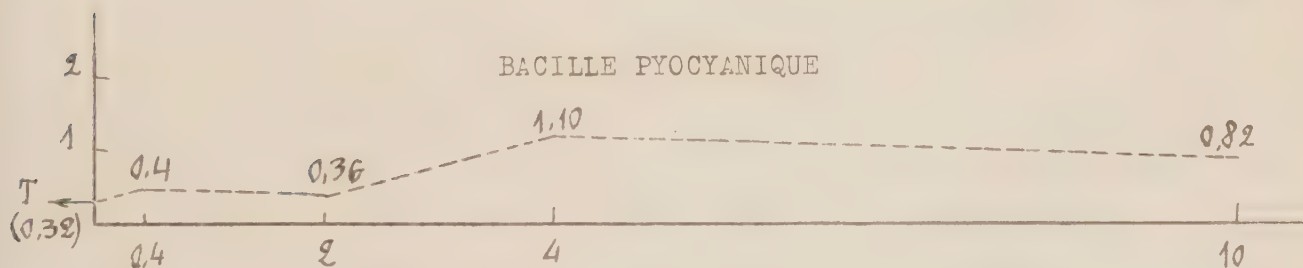
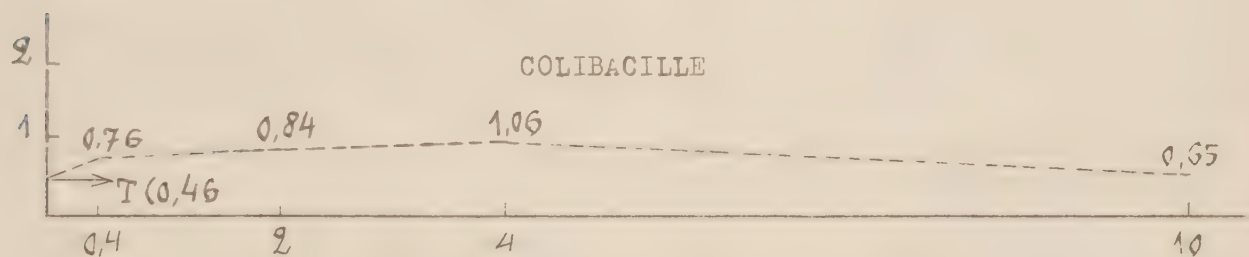
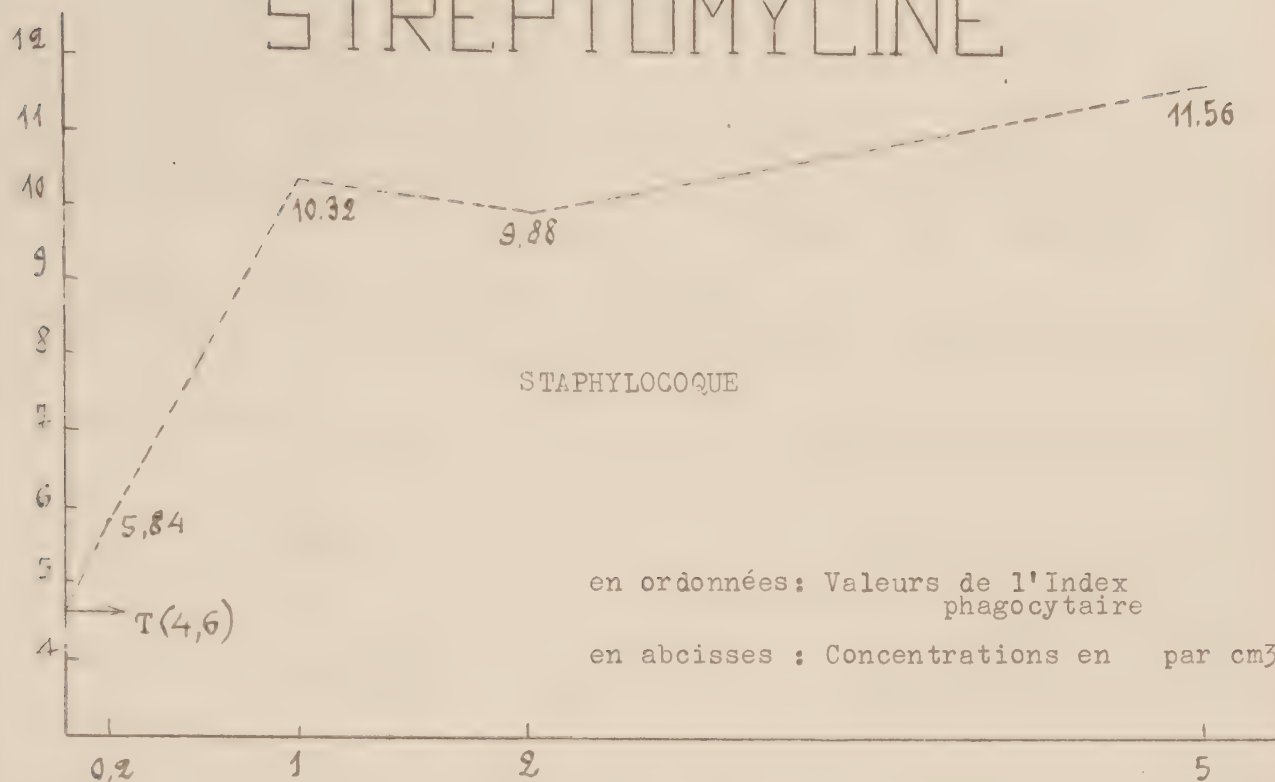
CHLORURE MERCURIQUE



PENICILLINE



STREPTOMYCINE



Conclusion

L'examen des tableaux et des courbes que nous avons établis nous montre que l'index phagocytaire déterminé sur les bactéries qui se sont multipliées au contact d'un antiseptique ou d'un antibiotique, est toujours supérieur à l'index phagocytaire déterminé sur des bactéries qui se sont normalement développées en bouillon.

La valeur de l'index phagocytaire déterminée sur les bactéries qui se sont développées en milieu exempt de substances inhibitrices, prise comme témoin, fut avec le Staphylocoque de 4,6.

Elle s'est montrée beaucoup plus faible avec les autres bactéries mises en expérience et fut :

pour le Colibacille de 0,46
pour le Bacille pyocyanique de 0,32
pour le Pneumobacille de 0,25

En présence des substances inhibitrices, les valeurs maxima de l'index phagocytaire que nous avons obtenues furent :

- avec la staphylocoque de : 9,8 (en présence de l'Iode)
12,5 (en présence de Phénol)
9 (en présence de Chlorure mercurique)
9,10 (en présence de Pénicilline)
11,56 (en présence de Streptomycine).

La phagocytose était presque totale, très peu de bactéries n'ayant pas été englobées par les leucocytes.

Avec les autres bactéries, les index phagocytaires maxima furent les suivants :

	Iodo	Cl ₂ Hg	Phénol	Péni- cillino	Strepto- mycino	T
Colibacille	1	1,20	1,40	1,45	1,06	0,46
B. pyocyanique	1,05	2,90	1,34	0,36	0,70	0,32
Pneumobacille	0,30	0,40	1,16	0,64	1,10	0,25

Il y a donc pour ces espèces bactériennes une élévation très nette de l'index phagocytaire, mais la phagocytose n'a jamais atteint, cependant, un degré très élevé et sur toutes les lames observées, de nombreuses bactéries ne se trouvaient pas incluses dans les phagocytes.

Si l'on compare les résultats obtenus sur les bactéries traitées à ceux obtenus sur les bactéries témoins non traitées, on constate que l'augmen-

tation de l'index phagocytaire est sensiblement du même ordre pour les diverses espèces bactériennes à l'étude.

Avec le Staphylocoque, l'index phagocytaire témoin est de 4.6 . Les index maxima obtenus après action des différentes substances inhibitrices oscillent de 9 à 12,5 et ont pour valeur moyenne 10.4.

La valeur de cet index a donc plus que doublé.

Le tableau suivant résume les variations de l'index phagocytaire et indique la valeur du rapport :

valeur moyenne des index phagocytaires maxima
valeur de l'index phagocytaire témoin

	Valeurs de l'index phagocytaire témoin	Valeurs limites de l'index phagocytaire	Valeur moyenne	rapport : <u>valeur moyenne</u> <u>valeur témoin</u>
Staphylocoque	4.6	9 - 12,5	10.4	2.3
Colibacille	0.46	1 - 1,45	1.22	2.7
Bacille pyocyanique	0.32	0.70 - 2,90	1.39	4.3
Pneumobacille	0.25	0.30 - 1.16	0.72	3

3) - POURCENTAGE DES LEUCOCYTES DOUES DE POUVOIR PHAGOCYTAIRE

Au cours de ses travaux sur la phagocytose, H.J.HAMBURGER (65) exprimait l'intensité de ce phénomène d'après le pourcentage des leucocytes doués de pouvoir phagocytaire en admettant que ce pourcentage était une fonction logarithmique de l'index phagocytaire.

Pour notre part, nous avons cherché à voir si le pourcentage des leucocytes qui possédaient une activité phagocytaire variait selon les concentrations des substances inhibitrices ayant agi sur les germes à phagocyter et s'il existait une relation entre ce pourcentage et l'index phagocytaire.

Avec les conditions techniques adoptées pour ces essais, aucun facteur n'était susceptible de modifier la physiologie des leucocytes au cours des expériences ; le seul facteur variable était la structure du germe soumis à des doses croissantes d'antiseptiques ou d'antibiotiques.

Sur les lames colorées, ayant servi à la détermination des index

phagocytaires, nous avons dénombré, d'une part les leucocytes ayant englobé une ou plusieurs bactéries, d'autre part, les leucocytes vides de tout germe; nous avons compté pour chaque détermination 200 leucocytes et exprimé le résultat en pourcentage de leucocytes ayant englobé des bactéries.

Dans le tableau suivant sont exprimés les résultats obtenus après examen des différentes lames ; ce tableau est divisé en deux parties : d'un côté figurent les pourcentages de leucocytes ayant manifesté un pouvoir phagocytaire, de l'autre, l'index phagocytaire précédemment déterminé ; on peut ainsi comparer facilement le pourcentage des leucocytes doués de pouvoir phagocytaire et la valeur de l'index phagocytaire.

Staphylocoque

	Pourcentage de leucocytes actifs						Index phagocytaires					
	S	S ₁	S ₂	S ₃	S ₄	S ₅	S	S ₁	S ₂	S ₃	S ₄	S ₅
Témoin	80						4.6					
Iode		75	70	78	85	---		5.26	6.38	8.18	9.8	---
Cl ₂ Hg		75	85	84	88	---		5.6	6.45	8	9	---
Phénol		74	80	76	83	85		6.	7.6	8.1	9.9	12.5
Pénicilline		82	80	75	85	---		4.98	4.64	6.80	9.1	---
Streptomycine		84	82	78	85	---		5.84	10.32	9.88	11.56	---

Colibacille

	C	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅
Témoin	24						0.46					
Iode		24	26	20	---	---		0.85	0.82	1	---	---
Cl ₂ Hg		18	22	22	18	---		0.5	0.85	0.8	1.20	---
Phénol		25	19	17	15	---		1.18	1.24	1.40	1.28	---
Pénicilline		22	19	15	18	16		0.78	0.75	1.1	1.45	1.10
Streptomycine		22	24	18	13	---		0.76	0.84	1.06	0.65	---

Bacille pyocyanique

	P	P ₁	P ₂	P ₃	P ₄	P	P ₁	P ₂	P ₃	P ₄
Témoin	22					0.32				
Iode		20	24	25	30		0.26	0.58	0.83	1.05
Cl ₂ Hg		20	15	18	---		1.50	2.25	2.90	---
Phénol		16	14	24	11		0.74	0.94	1.34	1.16
Pénicilline		16	18	12	---		0.44	0.56	0.96	---
Streptomycine		16	18	12	13		0.40	0.36	1.10	0.82

Pneumobacille

	Pourcentage de leucocytes actifs					Index phagocytaires				
	Pn	Pn ₁	Pn ₂	Pn ₃	Pn ₄	Pn	Pn ₁	Pn ₂	Pn ₃	Pn ₄
Témoin	18					0.30				
Iode		14	13	16	15		0.25	0.30	0.16	0.24
Cl ₂ H ₅		12	15	14	11		0.21	0.32	0.29	0.40
Phénol		19	15	18	14		0.20	0.32	0.23	0.16
Pénicilline		18	20	15	--		0.40	0.36	0.64	--
Streptomycine		13	12	11	15		0.50	0.54	0.36	0.70

Conclusion

L'examen de ces tableaux nous montre que la détermination des index phagocytaires est plus précise que celle du pourcentage des leucocytes actifs.

En règle générale, les index phagocytaires sont d'autant plus forts que les germes ayant servi à leur détermination ont été soumis à des doses plus élevées de substances inhibitrices.

Si nous prenons le cas du staphylocoque, par exemple, nous avons les résultats suivants :

avec l'iode

	S	S ₁	S ₂	S ₃	S ₄
concentration en iode en g. pour mille	0	0.01	0.05	0.10	0.20
index phagocytaire	4.6	5.25	6.38	8.18	9.8
pourcentage de leucocytes actifs	80	75	70	78	85

avec le phénol

	S	S ₁	S ₂	S ₃	S ₄	S ₅
concentration en phénol en g pour mille	0	0.01	0.05	0.10	0.50	1
index phagocytaire	4.6	6	7.6	8.1	9.9	12.5
pourcentage de leucocytes actifs	80	74	80	76	83	85

Dans ces deux exemples, la valeur de l'index phagocytaire croît régulièrement et cette observation peut être faite dans presque tous les cas. Au contraire, en ce qui concerne le pourcentage des leucocytes actifs, l'interprétation est plus difficile.

Avec le Staphylocoque, l'accroissement de ce pourcentage est faible et irrégulier :

75, 70, 78, 85 (avec l'iode)

74, 80, 76, 83, 85 (avec le phénol).

Avec les autres germes : Colibacille, Bacille pyocyanique, Pneumobacille, aucune conclusion ne peut être tirée de l'examen des tableaux.

Faut-il en conclure qu'il n'existe aucun rapport entre l'index phagocytaire et le pourcentage des leucocytes doués de pouvoir phagocytaire ?

Nous ne le pensons pas, car si nous considérons les résultats obtenus sur les germes témoins, nous voyons que le pourcentage des leucocytes actifs le plus fort correspond aux cas où l'index phagocytaire est le plus élevé.

	pourcentage des leucocytes actifs	Index phagocytaire
Staphylocoque	80	4.6
Colibacille	24	0.46
Bacille pyocyanique	22	0.32
Pneumobacille	18	0.30

L'accroissement de l'index phagocytaire est beaucoup plus rapide que celui du pourcentage des leucocytes actifs et nous pensons, pour notre part, que si la détermination du pourcentage des leucocytes actifs peut donner une idée du degré de la phagocytose, seule la détermination de l'index phagocytaire permet d'obtenir des résultats plus constants et beaucoup plus précis.

II - INFLUENCE DE L'AGE ET DE LA MORPHOLOGIE DES BACTERIES

SUR LA PHAGOCYTOSE

1) INFLUENCE DE L'AGE -

Au début de nos expériences, nous avons, lors de la mise au point de la technique, tenté de déterminer l'influence de l'âge de la culture microbienne sur la phagocytose : R. HARE (67), et S. MIELNIK-KOSMIDERSKI (198), avaient montré que les cultures jeunes sont beaucoup moins phagocytiques que des cultures âgées.

Essais personnels

Nous avons expérimenté sur des souches respectivement âgées de 1, 2, 4, 7 et 10 jours ensemencées en double exemplaire, en bouillon peptone salé de formule classique.

Des suspensions microbiennes titrant 200 millions de bactéries par cm³ étaient préparées et après contact avec la suspension leucocytaire, les étalonnages étaient effectués comme il a été décrit (voir page 59).

Les nombres que nous donnons ci-dessous expriment la moyenne de deux résultats, toutes les expériences ayant été réalisées en double ; sur les lames colorées, nous avons déterminé successivement : le pourcentage des leucocytes doués de pouvoir phagocytaire (% L) et la valeur de l'index phagocytaire (voir page 61).

Age des bactéries (en jours)	Staphylocoque		Colibacille		Bac. Pyocyanique		Pneumobacille	
	% L	Index	% L	Index	% L	Index	% L	Index
1	83	4.3	28	0.60	24	0.26	18	0.24
2	78	5	30	0.72	20	0.40	22	0.20
4	75	4.9	25	0.56	25	0.34	16	0.15
7	80	4.4	18	0.36	18	0.30	19	0.30
10	78	4	20	0.40	16	0.35	15	0.22

L'examen de ces résultats montre qu'il ne semble pas exister de relation constante entre l'âge des bactéries en essai et l'index phagocytaire. Le pourcentage de leucocytes actifs ne semble pas, non plus, être influencé par ce facteur.

Dans l'ensemble les variations sont relativement faibles, il semble que l'âge des bactéries ait peu d'importance quant à son influence

sur la phagocytose .

Tout au plus, peut-on constater une légère augmentation du pouvoir phagocytaire dans le cas de bactéries âgées de 48 heures (Staphylocoque, Colibacille, Bacille pyocyanique).

Cependant les plus fortes variations apparaissent avec le Colibacille, bactérie qui dans les cultures âgées prend des formes d'involutions filamenteuses ou des formes plus ou moins granuleuses.

Ces formes d'involutions que nous avons pu observer à partir du 4ème jour de culture apparaissaient beaucoup plus nombreuses au-delà du 7ème jour.

Le Bacille pyocyanique nous a également montré quelques formes d'involutions après une semaine, mais ces formes étaient moins nombreuses.

Nous n'avons pas mis en évidence de modifications morphologiques chez le Staphylocoque, formes d'ailleurs beaucoup moins faciles à déceler. Dans les cultures âgées de un à dix jours, les cocci semblaient toujours posséder la même taille et les mêmes propriétés tinctoriales.

Le Pneumobacille, très polymorphe de nature, ne nous a pas permis de faire d'observation intéressante à ce sujet.

Devant ces résultats négatifs, nous avons donc décidé d'utiliser au cours de nos expériences des souches âgées de 24 h. susceptibles de nous assurer la présence de bactéries présentant des caractères aussi constants que possible.

2) INFLUENCE DES SUBSTANCES INHIBITRICES SUR LA MORPHOLOGIE DES BACTERIES

L'action des antibiotiques sur la morphologie des bactéries a été l'objet de nombreux travaux. C.LEVADITI et A.VAISMAN (93) mirent en évidence l'apparition de formes géantes chez le colibacille sous l'influence de la Pénicilline ; A.BOIVIN, R.TULASNE, R.VENDRELY et R.MINCK (11) observèrent que le staphylocoque, en présence de doses subléthales de Pénicilline devenait plus volumineux et que le colibacille présentait des formes longues résultant d'une inhibition de la division cytoplasmique. Dans les années qui suivirent fut surtout étudiée l'influence que possédait la Pénicilline sur la morphologie du staphylocoque ; (R.TULASNE, R.VENDRELY) (136), du colibacille (R.TULASNE, R.MINCK) (135), (A.SHANAHAN et F.TANNER) (128), de la bactérie charbonneuse (R.MINCK et Mme A.MINCK) (109), et du bacille proteus (L.DIENES) (47), (R.TULASNE) (134).

L'action de la Streptomycine fut étudiée par C.LEVADITI et J.HENRY (9), celle de différents antibiotiques, tels la gramicidine, la polymyxine par M.WELSH, E.NIHOUL, C.DELEMENNE-JAMINON (142).

Plus récemment, C.LEVADITI, A.VAISMAN et J.HENRY EVENO (94) étudièrent à nouveau l'influence de la Pénicilline sur la morphologie des

bactéries en utilisant le microscope à contraste de phase et trouvèrent des résultats identiques à ceux qu'ils avaient obtenus quelques années avant.

M.R.J.SALTON, R.W.MORNE et V.E.GOSSETT (125) examinant au microscope électronique des bactéries traitées par le bromure de cétyltriméthylammonium constatèrent une contraction du cytoplasme et son éloignement de la membrane d'enveloppe.

Au cours des différentes numérations que nous avons effectuées, les modifications morphologiques des bactéries, dues à l'influence des différentes substances inhibitrices utilisées, nous sont apparues très rapidement. En général, sous l'influence des substances étudiées, les cocci augmentaient de diamètre et les bacilles prenaient des formes plus ou moins longues ou ramifiées.

Sur certaines lames, les propriétés tinctoriales des bactéries nous sont apparues également modifiées comme l'avaient déjà observé C.LEVADITI et J.HENRY (90).

Ces modifications morphologiques et tinctoriales étaient d'autant plus accusées que les doses des substances antiseptiques ou antibiotiques, au contact desquelles s'étaient développées les bactéries, étaient plus élevées. Cependant, ce phénomène ne nous est pas apparu absolument général.

Ces modifications morphologiques ont été une des raisons pour lesquelles nous n'avons pas effectué la détermination de l'index phagocytaire correspondant aux doses voisines de la dose antigénétique. Très souvent, en effet, la morphologie apparaissait si altérée avec les doses voisines des doses antigénétiques, que la détermination de la teneur en bactéries de la suspension microbienne, réalisée à l'aide de l'électrophotomètre de Meunier, ne pouvait plus avoir la précision requise. Or, nous avons vu que la connaissance aussi exacte que possible du nombre de bactéries mis en jeu est une condition essentielle pour interpréter les résultats du phénomène de phagocytose.

En particulier, les bactéries étudiées prenaient dans certains cas un aspect granuleux et leur coloration était beaucoup moins nette que celle des bactéries non traitées. La numération était de ce fait rendue très difficile.

Ces observations nous ont incité à étudier l'influence des diverses concentrations des substances inhibitrices à l'étude sur la morphologie des espèces bactériennes en essai, en rappelant les variations concomitantes de l'index phagocytaire.

Nous avons tout d'abord examiné sur les lames que nous avions préparées pour les essais de phagocytose la morphologie des différentes bactéries. Cet examen a été opéré à l'aide d'un objectif à immersion au 1/15 et d'un oculaire n° 4.

Nous avons dessiné à la chambre claire l'aspect que présentaient

les diverses bactéries après 24 heures de culture en bouillon, en présence de doses croissantes des différentes substances antiseptiques ou antibiotiques.

Nous donnons ci-dessous les résultats des essais effectués respectivement avec :

- 1e Staphylocoque
- 1e Colibacille
- 1e Bacille Pyocyane
- 1e Pneumobacille
- 1e Bacille mesentericus

mis au contact de concentrations croissantes :

- 1°) d'Iode
- 2°) de Phénol
- 3°) de Chlorure mercurique
- 4°) de Pénicilline
- 5°) de Streptomycine

1) Exposé des résultats obtenus en présence de concentrations croissantes en Iode - (ces concentrations sont exprimées en grammes pour 1.000 cm³ de milieu).

a) Staphylocoque

					
	S	S ₁	S ₂	S ₃	S ₄
concentration en IODE	0	0.01	0.05	0.10	0.20
index phagocytaire	4.6	5.26	6.38	8.18	9.8

S et S₁ = bactéries de taille uniforme

S₂ = quelques formes de plus grand diamètre apparaissent mais restent exceptionnelles

S₃ et S₄ = les formes de plus fort diamètre apparaissent beaucoup plus nombreuses et une estimation approximative permet de chiffrer entre 30 et 40 % le pourcentage de ces formes.

b) Colibacille



C



C₁



C₂



C₃

concentration
en IODE

0

0.05

0.15

0.30

Index phagocytaire

0.46

0.85

0.82

1

L'examen des différentes lames a montré dans l'ensemble une constance marquée de la morphologie du colibacille : il ne semble pas que les doses d'iode que nous avons utilisées modifient la morphologie de cette bactérie.

Remarquons seulement que les formes C₃ (correspondant au tube contenant 0,30 g pour 1.000 d'iode) semblent un peu moins nettes que les autres, sans pour cela pouvoir être qualifiées de formes altérées.

c) Bacille pyocyanique



P



P₁



P₂



P₃



P₄

concentration
en IODE

0

0.01

0.05

0.10

0.20

Index phagocytaire

0.32

0.26

0.58

0.83

1.05

La morphologie ne semble pas influencée par l'iode ; la longueur des bactéries reste inchangée ; quelques formes un peu plus trapues, un peu plus épaisses apparaissent sur les deux dernières lames mais la variation est très faible.

d) Pneumobacille de Friedlander



Pn

Pn₁

Pn₂

Pn₃

Pn₄

concentration
en IODE

0

0.01

0.05

0.10

0.20

Index phagocytaire

0.30

0.25

0.30

0.16

0.24

Pn, Pn₁, Pn₂ : morphologie classique du pneumobacille

Pn₃ : sur cette lame apparaissent relativement plus nombreuses les formes courtes, rares sur les lames précédentes.

Pn₄ : les bactéries apparaissent plus altérées, leurs bords sont moins nets, leur coloration moins bonne; certaines présentent un aspect granuleux.

La capsule qui apparaît altérée sur la troisième lame a pratiquement disparu sur la dernière lame (les capsules étant nettement visibles, nous n'avons pas jugé utile de les colorer).

e) Bacille mesentericus non sporulé



M

M₁

M₂

M₃

concentration
en IODE

0

0.01

0.05

0.10

Index phagocytaire

+ / ++

+

+ / ++

++

Dans l'ensemble, on ne constate sous l'influence de l'iode que des variations morphologiques assez faibles; les chaînettes ont tendance à s'allonger et les formes bactériennes à devenir plus longues.

II) Résultats obtenus en présence de concentrations croissantes en PHENOL

(ces concentrations sont exprimées en grammes pour 1.000 cm³ de milieu).

a) Staphylocoque



S₁ S₂ S₃ S₄ S₅

concentration
en PHENOL

0.01 0.05 0.10 0.50 1

Index phagocytaire

6 7.6 8.1 9.9 12.5

La morphologie varie très peu, quelques cocci ont un diamètre légèrement augmenté, mais ces formes restent rares, même sur les dernières lames.

b) Colibacille



C₁ C₂ C₃ C₄

concentration
en PHENOL

0.01 0.05 0.10 0.50

Index phagocytaire

1.18 1.24 1.40 1.28

Les modifications morphologiques du colibacille apparaissent légères sous l'influence du phénol ; dans l'ensemble, à doses croissantes, les formes courtes et trapues semblent devenir plus nombreuses, tandis que les formes longues restent rares.

c) Bacille pyocyane

				
	P ₁	P ₂	P ₃	P ₄
concentration en PHENOL	0.01	0.05	0.10	0.50
Index phagocytaire	0.74	0.94	1.34	1.16

Les bactéries tendent à devenir plus larges, plus trapues.
Sur la dernière lame, la coloration est nettement moins bonne.

d) Pneumobacille de Friedlander

				
	Pn ₁	Pn ₂	Pn ₃	Pn ₄
concentration en PHENOL	0.01	0.05	0.10	0.50
Index phagocytaire	0.20	0.32	0.23	1.16

Seule la dernière lame montre une modification morphologique ;
les formes deviennent plus courtes, à contours moins nets, à coloration moins bonne.

Les capsules apparaissent nettement altérées sur cette dernière lame, tandis qu'aucune modification n'était décelable sur les trois premières lames.

c) Bacille mesentericus



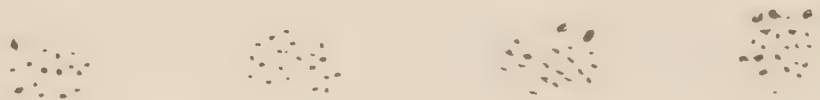
M₁ M₂ M₃ M₄ M₅

concentration en PHENOL	0.01	0.05	0.10	0.50	1
Index phagocytaire	+	+	+ / ++	++	++

On observe une tendance générale à l'allongement des bactéries ;
à l'extrémité de certains bacilles apparaissent des petits corpus-
cules que l'on ne retrouve pas sur les premières lames, traduisant,
semble-t-il, des condensations cytoplasmiques.

III) Résultats obtenus en présence de concentrations croissantes en
CHLORURE MERCURIQUE - (ces concentrations sont exprimées en milli-
grammes pour 1.000 cm³ de milieu).

a) Staphylocoque



S₁ S₂ S₃ S₄

concentration en Cl ₂ Hg	0.01	0.05	0.10	0.50
Index phagocytaire	5.6	6.45	8	9

Des formes de diamètre supérieur apparaissent uniquement sur la
dernière lame.

b) Colibacille

				
	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄
concentration en Cl ₂ Hg	0.05	0.10	0.50	1
Index phagocytaire	0.5	0.85	0.8	1.20

Aucune modification morphologique ne fut observée.

c) Bacille pyocyannique

				
	P ₁	P ₂	P ₃	P ₄
concentration en Cl ₂ Hg	0.05	0.10	0.50	1
Index phagocytaire	1.5	2.25	2.90	

On note une légère tendance à l'épaississement et au raccourcissement des formes bactériennes sur les deux dernières lames.

d) Pneumobacille de Friedlander

				
	Pn ₁	Pn ₂	Pn ₃	Pn ₄
concentration en Cl ₂ Hg	0.05	0.10	0.50	1
Index phagocytaire	0.21	0.32	0.29	0.40

Peu de modifications sont visibles ; la dernière lame montre des

bactéries d'aspect moins net, légèrement granuleuses, moins colorables ; la capsule se montre également altérée.

e) Bacille mesentericus



M₁

M₂

M₃

M₄

concentration
en Cl₂Hg

0.05

0.10

0.50

1

Index phagocytaire

+

+

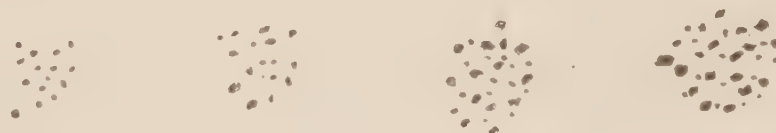
++

++

Les germes et les chaînettes s'allongent et il apparaît des corpuscules terminaux.

IV) Résultats obtenus en présence de concentrations croissantes de
PENICILLINE - (ces concentrations sont exprimées en U.O. par
cm³ de milieu).

a) Staphylocoque



S₁

S₂

S₃

S₄

concentration
en PENICILLINE

0.001

0.002

0.01

0.05

Index phagocytaire

4.98

4.64

6.8

9.10

La morphologie change ici très rapidement.

S₁ : les staphylocoques ne présentant pas de modifications morphologiques

S₂ : quelques formes plus développées apparaissent déjà

S₃ : les cocci de forte taille apparaissent nombreux (50% environ).

S₄ : les formes plus développées deviennent la majorité et certains cocci sont beaucoup plus gros que sur la lame S₃.

b) Colibacille



	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅
concentration en PENICILLINE	1	4	10	20	40
Index phagocytaire	0.78	0.75	1.10	1.45	1.10

Avec la pénicilline, la morphologie du colibacille apparaît, dans l'ensemble, très altérée.

C₁ ! aucune modification n'apparaît

C₂ : les formes longues sont plus nombreuses

C₃ : certains éléments prennent la forme de longs filaments

C₄ et C₅ : les formes longues ont tendance à disparaître ; la bactérie tend à reprendre sa taille normale, mais elle devient granuleuse, mal colorable et la lecture de ces lames s'est révélée difficile.

c) Bacille pyocyanique



	P ₁	P ₂	P ₃	P ₄
concentration en PENICILLINE	200	1.000	2.000	5.000
Index phagocytaire	0.44	0.56	0.96	--

On note une tendance des bactéries à devenir plus épaisses et beaucoup plus longues. Il semble que ce soit la Pénicilline qui modifie le plus la morphologie du Bacille pyocyanique.

d) Pneumobacille



Pn₁ Pn₂ Pn₃ Pn₄

concentration
en PENICILLINE

0.1 0.2 1 5

Index phagocytaire

0.40 0.36 0.64 --

Les deux dernières lames montrent l'apparition de formes allongées que nous n'avions pas observées après action des substances antiseptiques précédemment étudiées. La capsule apparaît également très altérée sur les dernières lames.

e) Bacille mesentericus



M₁ M₂ M₃ M₄

concentration
en PENICILLINE

0.02 0.1 0.2 1

Index phagocytaire

+ + / ++ ++ +

Sur les deux dernières lames, on peut observer un épaississement des filaments qui deviennent très ramifiés, ainsi que la présence de nombreux corpuscules.

V) Résultats obtenus en présence de concentrations croissantes en

STREPTOMYCINE - (ces concentrations sont exprimées en γ par cm³ de milieu)

a) Staphylocoque

				
	S ₁	S ₂	S ₃	S ₄
concentration en STREPTOMYCINE	0.2	1	2	5
Index phagocytaire	5.84	10.32	9.38	11.56

Apparition en S₃ et S₄ de formes plus développées.

La morphologie des bactéries n'est cependant pas comparable à celle observée après action de la Pénicilline.

b) Colibacille

				
	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄
concentration en STREPTOMYCINE	0.4	2	4	10
Index phagocytaire	0.76	0.84	1.06	0.65

On peut noter l'apparition de quelques formes longues relativement peu développées sur la dernière lame.

c) Bacille pyocyannique

				
	P ₁	P ₂	P ₃	P ₄
concentration en STREPTOMYCINE	0.4	2	4	10
Index phagocytaire	0.40	0.36	1.10	0.82

- P_1 et P_2 : aucune modification n'est visible
 P_3 : on peut noter la présence de quelques formes plus longues et légèrement plus trapues.
 P_4 : les formes longues sont plus nombreuses ; quelques bactéries prennent un aspect légèrement granuleux et leur coloration se révèle plus difficile.

d) Pneumobacille de Friedlander

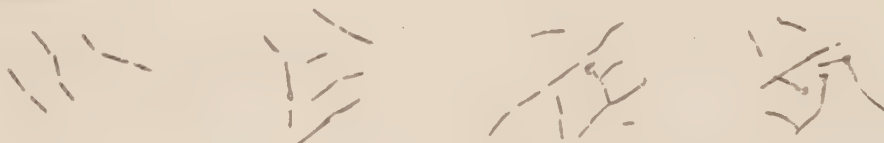


	Pn_1	Pn_2	Pn_3	Pn_4
concentration en STREPTOMYCINE	0.04	0.08	0.32	0.8
Index phagocytaire	0.50	0.54	0.36	0.70

Les bactéries deviennent plus trappues ; sur la dernière lame, elles prennent un aspect granuleux assez marqué et se colorent très mal.

La capsule disparaît rapidement ; l'examen de la seconde lame révèle déjà une altération de la capsule qui, à peine visible sur la troisième lame, a totalement disparu sur la dernière.

e) Bacille mesentericus



	M_1	M_2	M_3	M_4
concentration en STREPTOMYCINE	0.01	0.05	0.15	0.40
Index phagocytaire	+	+ / ++	++	+

Les observations que l'on peut faire sur la morphologie sont analogues à celles que l'on a faites précédemment en ce qui concerne l'action de la pénicilline sur la morphologie de cette bactérie. Les corpuscules apparaissent cependant moins nombreux et moins développés.

Conclusion

La morphologie des différentes espèces microbiennes utilisées au cours de ces essais, est en général beaucoup plus profondément modifiée par la pénicilline et la streptomycine que par l'iode, le phénol ou le chlorure mercurique.

Les condensations cytoplasmiques que nous avons pu observer avec le *Bacille mesentericus ruber* sont particulièrement volumineuses et nombreuses après contact avec la pénicilline et la streptomycine. Après action du phénol et du chlorure mercurique, ces condensations cytoplasmiques sont peu apparentes. Elles sont inexistantes après action de l'iode.

La capsule du *Pneumobacille* de Friedlander est régulièrement altérée après contact de cette bactérie avec les concentrations les plus fortes des différents antiseptiques ou antibiotiques étudiés. Cependant, on peut noter l'action beaucoup plus énergique qu'exerce sur la capsule de cette bactérie la streptomycine. L'examen de la seconde lame de la série met déjà en évidence une altération de la capsule. L'examen des troisième et quatrième lames montre la disparition de la capsule.

Les variations de la morphologie du *Staphylocoque* qui se traduisent uniquement par une augmentation du diamètre des cocci apparaît très rapidement avec la pénicilline. On observe après action de cet antibiotique des cocci possédant un diamètre très supérieur au diamètre normal. Les modifications sont moins accentuées après action de la streptomycine et de l'iode. Le phénol et le chlorure mercurique apportent très peu de modifications.

Les modifications morphologiques du *Colibacille* et du *Bacille pyocyanique* apparaissent également plus accentuées après contact avec les deux antibiotiques étudiés : pénicilline et streptomycine. Ces deux substances font apparaître des formes longues assez nombreuses que l'on ne peut observer après action de l'iode, du phénol ou du chlorure mercurique sur le *Colibacille* ou le *Bacille pyocyanique*.

Soulignons enfin qu'en règle générale, les propriétés tinctoriales des différentes espèces bactériennes soumises à l'action des diverses substances inhibitrices aux plus fortes concentrations employées se trouvent modifiées. Les bactéries se colorent mal et prennent un aspect granuleux. Seule la coloration du *Staphylocoque* n'apparaît pas modifiée.

3) INFLUENCE DE LA MORPHOLOGIE DES BACTERIES SUR LA PHAGOCYTOSE

Les premières observations que nous avons rapportées montrent l'influence de la teneur du milieu de culture en substances antiseptiques ou antibiotiques sur la morphologie des bactéries. Ces essais avaient été entrepris dans le but de rechercher si le pouvoir phagocytaire des leucocytes s'exerce sur les formes normales ou altérées des bactéries. Or, s'il nous était possible de dénombrer les bactéries phagocytées, il nous fut prati-

quement impossible d'apprécier avec une précision suffisante la morphologie de ces bactéries phagocytées pour en pouvoir tirer des conclusions.

Nous avons donc effectué une série d'expériences sur la bactérie dont les variations de longueur se montraient les plus apparentes : Escherichia coli.

Le protocole de ces expériences fut le suivant :

A partir d'une culture en bouillon d'Escherichia coli âgée de 24 heures, en absence de toute substance antiseptique ou antibiotique, nous avons préparé une suspension en eau physiologique titrant 200 millions de bactéries par cm³.

Après avoir déposé sur plusieurs lames une goutte de cette suspension, nous réalisons les étalements et après fixation par le mélange alcool-éther, nous colorions la préparation à la fuschine diluée..

A l'aide de cette même suspension nous réalisons l'expérience de phagocytose selon la technique déjà décrite.

Nous avons alors déterminé le pourcentage des bactéries de longueurs différentes :

- d'une part sur les étalements ne contenant que les bactéries,
- d'autre part sur les étalements réalisés après l'acte de phagocytose et sur lesquels nous distinguons des bactéries libres et des bactéries phagocytées.

Sur cette dernière série de lames était mesurée la longueur des seules bactéries non phagocytées.

Nous avons compté séparément :

les bactéries dont la longueur était inférieure à 2 μ

les bactéries dont la longueur variait de 2 μ à 5 μ

les bactéries dont la longueur était supérieure à 5 μ

Les longueurs des colibacilles ont été déterminées en utilisant le système de la chambre claire avec un grossissement de 860.

Après avoir compté mille éléments sur chaque série de lames, les résultats obtenus ont été les suivants :

Essai n° 1

a) numération effectuée sur les Colibacilles de la suspension -

Longueur des Colibacilles exprimée en "	Nombre de bactéries observées	Pourcentage des bactéries
< 2	58	5.8
de 2 à 5	840	84
> 5	102	10.2

b) numération effectuée sur les Colibacilles non phagocytés -

Longueur des Colibacilles exprimée en "	Nombre de bactéries observées	Pourcentage des bactéries
< 2	80	8
de 2 à 5	802	80.2
> 5	118	11.8

Aucune conclusion ne pouvant se dégager de ces résultats, nous avons renouvelé nos expériences et obtenu les résultats suivants :

Essai N°2

a) numération effectuée sur les Colibacilles de la suspension -

Longueur des Colibacilles exprimée en "	Nombre de bactéries observées	Pourcentage des bactéries
< 2	74	7.4
de 2 à 5	784	78.4
> 5	142	14.2

b) numération effectuée sur les Colibacilles non phagocytés -

Longueur des Colibacilles exprimée en μ	Nombre de bactéries observées	Pourcentage des bactéries
< 2	54	5.4
de 2 à 5	862	86.2
> 5	84	8.4

Les résultats de ces deux séries d'essais sont résumés dans le tableau suivant :

Longueur des Colibacilles exprimée en μ	pourcentage de répartition des bactéries :					
	de la suspension			non phagocytés		
	1 ^{er} num.	2 ^{ème} num.	moyenne	1 ^{er} num.	2 ^{ème} num.	moyenne
< 2	5.8	7.4	<u>6.6</u>	8	5.4	<u>6.7</u>
de 2 à 5	84	78.4	<u>81.2</u>	80.2	86.2	<u>83.2</u>
> 5	10.2	14.2	<u>12.2</u>	11.8	8.4	<u>10.1</u>

Conclusion

Le pourcentage des bactéries de différentes tailles restées libres après phagocytose se montre donc sensiblement identique au pourcentage de répartition des bactéries existant dans la suspension initiale.

Nous pouvons donc conclure de ces essais que les phagocytes ont englobé dans des proportions semblables les bacilles de tailles différentes, ce que semblait bien annoncer la simple observation microscopique.

III - INFLUENCE DE L'ION CALCIUM SUR LA PHAGOCYTOSE ET LE TACTISME LEUCOCYTAIRE

VARIATIONS EN FONCTION DE L'ACIDE SALIFIANT LE CALCIUM

De nombreuses séries de travaux ont été effectuées pour étudier l'influence de divers ions sur la phagocytose.

H.J.HAMBURGER (65) étudia la phagocytose de particules de carbone par les leucocytes de cheval en solutions isotoniques de ClNa , BrNa et Ina ; il put observer que l'anion iode diminue très fortement la phagocytose, tandis que les anions Cl et Br donnent des résultats sensiblement équivalents ; ainsi, après 45 minutes de contact avec la solution saline :

43,2 %	des cellules	soumises	à l'action	du ClNa
44 %	"	"	"	" du BrNa
0,5 %	"	"	"	" du Ina

se montrent encore capables de phagocyter les particules de carbone.

Le fluorure,^{le} sulfite et le citrate de sodium diminuent également l'intensité du phénomène. Dans la plupart des cas, un lavage des cellules soumises aux solutions salines permet de supprimer l'action nocive de ces dernières ; dans certains cas, ce serait la toxicité du sel pour les leucocytes qui expliquerait la diminution de la phagocytose : telle est l'opinion de H.H.EGGERS (50) dans le cas du Cl_2Fe et du FNa ; selon d'autres auteurs, L.HEKTOEN et G.F.RUEDIGER (69), la diminution d'intensité du phénomène de phagocytose s'expliquerait par l'empêchement de l'opsonisation des bactéries.

Les différentes hypothèses formulées sont, dans l'ensemble, assez incertaines ; certains auteurs admettent que l'influence des ions s'explique par une modification de l'adsorption des composants sériques sur les particules ; d'autres pensent que les ions exercent une influence directe sur les leucocytes et admettent l'existence d'échange d'ions entre les cellules et la solution.

Actuellement, à la suite d'un travail de D.R.BRIGGS (13) confirmant l'opinion de E.GELLHORN (59) et de R.ROBER (72), il apparaît que les séries d'ions affectent certaines propriétés de surface de leurs propriétés lyophiles : "toutes choses étant égales, plus grande sera la lyophilite d'un ion pour son solvant, moindre sera sa tendance à quitter la phase liquide pour la couche interfaciale."

La phagocytose étant en partie sous la dépendance de forces aux interfaces cellules-milieu-particules, une relation avec la lyophilite des ions semble être l'hypothèse la plus favorable.

Influence de l'Ion Calcium -

L'influence de l'ion calcium sur la phagocytose et le tactisme leucocytaire fut particulièrement étudiée du fait de son importance toute particulière. H.J.HAMBURGER (65) montra le premier l'action favorisante du Cl_2Ca , à dose déterminée, sur la phagocytose ; en solution isotonique de ClNa , 20,6 % des cellules mises en expérience phagocytèrent les particules ; après addition de 0,2 % de Cl_2Ca , le pourcentage des cellules phagocytaires s'élevait à 27,6 %. Le même auteur montra que le Cl_2Ca renversait l'effet dépressif dû à un contact prolongé des cellules dans une solution isotonique de ClNa : ainsi 5,8 % de cellules laissées 24 heures au contact d'une solution isotonique de ClNa se montraient douées de pouvoir phagocytaire tandis que 44,4 % de cellules fraîches possédaient ce pouvoir ; après adjonction de 0,05 % de Cl_2Ca aux cellules exposées 24 heures à la solution de ClNa , 50,8 % de ces cellules devenaient capables de phagocyter les particules mises à leur contact.

Dans la dernière partie de son travail, HAMBURGER montra que l'ion calcium n'augmentait pas le pourcentage des cellules phagocytaires mais seulement la vitesse de la phagocytose ; nous reproduisons ci-dessous un des tableaux qui illustre cette conclusion et dans lequel figurent les pourcentages des leucocytes actifs après des temps de contact déterminés, soit dans une solution isotonique de ClNa , soit dans une solution isotonique de ClNa à laquelle a été ajouté 0,05 % de Cl_2Ca :

Temps en minutes	Sol.isotonique de ClNa	Sol.isotonique de $\text{ClNa} + 0,05 \% \text{Cl}_2\text{Ca}$
10	31.2	30.6
20	31.7	39.9
30	41.5	58.5
60	48.2	65.9
90	64	59.6
120	65.1	66.1

T.KANAI (76) reprenant l'étude de l'influence des ions calcium sur la phagocytose trouva qu'une concentration optima de 0.02 % de Cl_2Ca , dans une solution saline de ClNa et de protéines, permettait d'observer la phagocytose la plus marquée ; selon l'auteur, les particules se trouveraient, à cette concentration bien déterminée, plus complètement recouvertes de protéines, ce qui expliquerait la meilleure phagocytose.

R.TUNNICLIFF (138), expérimentant in vivo, montra que l'injection par voie intra veineuse de plusieurs sels de calcium augmente l'index phagocytaire.

Plus récemment, étudiant l'action de l'ion calcium sur le tactisme

leucocytaire, A. DELAUNAY (20) montra que "pour une surcharge inférieure à 1/10 de milligramme par cm^3 on ne constate aucune action vraiment appréciable du sel sur le tactisme des globules blancs ; au 1/10 de mg, en revanche, on discerne une action favorisante très nette de l'ion calcium : le tactisme s'est effectué de façon beaucoup plus rapide que sur la lame témoin ; aux concentrations supérieures, cette action favorisante tend progressivement à diminuer pour se transformer finalement en action inhibitrice dès qu'on opère avec des doses supérieures à 10 milligrammes de calcium par cm^3 ; aux doses encore plus élevées, 100 mg par cm^3 , par exemple, il ne se produit plus aucun mouvement leucocytaire ; bien plus, les leucocytes apparaissent altérés, étirés, crénelés ; vraisemblablement, ils sont tués".

Par surcharge en calcium, il faut entendre la quantité d'ion calcium que l'on ajoute à un cm^3 de la suspension leucocytaire, c'est-à-dire, au liquide péritonéal.

C'est ainsi que, si l'on ajoute un cm^3 d'une solution de chlorure de calcium contenant 20 mg d'ion calcium par cm^3 , à un cm^3 d'une suspension leucocytaire, l'apport en Ca qui est de 20 mg se trouve réparti dans deux cm^3 et amène une surcharge en ion calcium de 10 mg par cm^3 .

Et le même auteur poursuit : "une dose de citrate de sodium suffisante pour empêcher tout déplacement leucocytaire ne supprime pas, en même temps, le pouvoir qu'ont les globules blancs d'englober des corps étrangers ; les sels de calcium sont donc moins nécessaires pour la phagocytose que pour le tactisme ; c'est ainsi qu'une dose de citrate de sodium de l'ordre de 5 mg par cm^3 , dose suffisante pour empêcher tout tactisme leucocytaire dans un exsudat par blocage du calcium, permet encore aux globules blancs de ce milieu d'absorber des microbes vivants, tels que des staphylocoques.

"Sans doute elle ralentit ce dernier phénomène de manière évidente ; pourtant, elle ne l'entrave pas complètement.

"Par cette expérience, nous apportons la preuve que les deux propriétés essentielles du leucocyte : son pouvoir de se déplacer, son pouvoir phagocytaire, peuvent être dissociés l'une de l'autre ; on voit ainsi que, contrairement à ce qu'avaient imaginé certains auteurs, l'acte d'englobement n'est pas qu'une simple et banale conséquence de l'acte de cheminement. Du reste, la nature nous offre un exemple de cette dissociation entre les deux fonctions des phagocytes, puisqu'elle nous montre à côté des phagocytes mobiles comme des leucocytes du sang, les phagocytes fixes du système réticulo-endothélial."

ESSAIS PERSONNELS

L'importance reconnue à l'ion calcium dans le phénomène de phagocytose nous a incité à étudier quantitativement l'influence de cet ion sur le tactisme leucocytaire et sur l'acte phagocytaire proprement dit.

Il nous a semblé particulièrement intéressant de rechercher si cette influence pouvait subir quelque variation, en fonction de l'acide salifiant l'ion calcium, selon les conceptions émises par J. REGNIER, découvertes tout

d'abord dans l'étude des substances anesthésiques locales, puis appliquées par J. REGNIER et ses élèves (119 bis) à l'étude de diverses autres substances alcaloïdiques et notamment de la morphine.

Rappelons que l'activité des sels d'une même base semblait dans toutes ces recherches s'orienter dans deux directions différentes ; les sels d'acides gras ou aromatiques ne possédant pas d'autre fonction qu'un carboxyle manifestaient généralement une action plus intense que celle du chlorhydrate de la même base. Les sels d'acides porteurs de plusieurs fonctions (carboxyle, hydroxyle, azote aminé) se montraient, au contraire, moins actifs que ce sel.

J. REGNIER fut ainsi conduit à attacher un rôle considérable aux groupements peptiques des anions dans l'activité pharmacodynamique.

Les nombreuses recherches physicochimiques entreprises pour tenter d'expliquer ces constatations (mesure de conductivité, d'hydrolyse, d'adsorption, de tension superficielle, de solubilité, de gonflement, de floculation de sols colloïdaux) conduisirent à la conclusion que l'influence de l'anion dépend principalement de sa lyophilie avec les molécules du solvant, et, d'autre part, de l'impossibilité de dissocier le rôle revenant à anion et cation qui semblent bien intervenir chacun pour leur part mais dont l'union par quelque liaison interne les conduit à agir comme une molécule entière.

Ces faits étant acquis, nous avons, pour notre part, étudié l'influence de l'ion calcium sur le phénomène de phagocytose en mettant en expérience le chlorure de calcium adopté comme témoin et d'autre part quelques-uns des acides utilisés par J. REGNIER au cours de ses dernières recherches.

Nous donnons dans le tableau suivant la liste de ces sels, ainsi que leur poids moléculaire ; nous indiquons pour chacun d'eux la proportion de calcium présente.

Sels utilisés

Les sels minéraux et organiques suivants ont été utilisés :

		P.M.	Pourcentage en calcium :
Chlorure de Ca	Cl_2Ca	111	Ca : 36,03
Formiate de Ca	$(\text{H CO}_2)^2 \text{Ca}$	130	Ca : 30,80
Acétate de Ca	$(\text{CH}_3 \text{CO}_2)^2 \text{Ca}$	176	Ca : 22,72
Benzoate de Ca	$(\text{C}_6\text{H}_5 \text{CO}_2)^2 \text{Ca} \cdot \text{OH}_2$	354	Ca : 11,30
Isobutyrate de Ca	$\left[\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \diagup \\ \text{CH} - \text{CO}_2 \\ \diagdown \\ \text{CH}_3 \end{array} \right]^2 \text{Ca}$	214	Ca : 18,7

	P.M.	Pourcentage en calcium
Phénylbutyrate de Ca $\left[\text{C}_6\text{H}_5 - (\text{CH}_2)^2 - \text{CO}_2 \right]^2 \text{Ca}$	366	Ca : 10,93
Gluconate de Ca $\left[\text{CH}_2\text{OH} - (\text{CHOH})^4 - \text{CO}_2 \right]^2 \text{Ca} \cdot \text{OH}_2$	448	Ca : 8,94
Phénylbutylacétate de Ca $\left[\begin{array}{c} \text{C}_6\text{H}_5 \\ \diagdown \\ \text{CH} - \text{CO}_2 \\ \diagup \\ \text{C}_4\text{H}_9 \end{array} \right]^2 \text{Ca}$	422	Ca : 9,48
Salicylate de Ca $\left[\text{C}_6\text{H}_4 \begin{array}{c} \text{CO}_2 \\ \diagdown \\ \text{OH} \end{array} \right]^2 \text{Ca} \cdot 2 \text{OH}_2$	350	Ca : 11,43

A partir de ces différents sels furent préparées des solutions dont les titres en ion calcium étaient les suivants :

20 , 4 , 1 , 0.20 et 0.04 g pour mille

de façon à ce que les surcharges en ion Ca, exprimées en milligrammes par cm³ soit respectivement de :

10 , 2, 0.5 , 0.10 et 0.02

Le chlorure de calcium étant très soluble, la solution mère à 20 pour mille ne présente aucune difficulté ; avec les sels organiques, solubles pour la plupart mais à un degré différent, il fut impossible pour certains d'obtenir la solution la plus concentrée, c'est-à-dire celle à 20 pour mille.

Tel fut le cas pour le benzoate, le gluconate, le phényl-butyrat, le phénylbutylacétate, le salicylate de calcium, sels pour lesquels la solution la plus concentrée que nous ayons pu préparer fut celle à 4 pour 1.00

Le mélange des solutions de sels de calcium et d'exsudat leucocytaire se faisant à parties égales en mélangeant 0,5 cm³ de chacune des solutions, nous nous sommes assuré du pH des différentes solutions, afin de voir si celui-ci ne pouvait venir perturber les résultats soit du tactisme, soit de la phagocytose, du fait d'une alcalinité ou d'une acidité trop forte.

Les solutions des sels minéraux et organiques de Ca utilisés aux différentes concentrations réalisées, possédaient un pH variant de 8,2 à 6,9. Il ne semble donc pas que le mélange à parties égales de chacune de ces différentes solutions à l'exsudat péritonéal puisse amener un changement de pH susceptible de modifier les conditions d'expérience.

Influence de l'ion calcium sur le tactisme leucocytaire et la phagocytose.

Technique utilisée

Nous avons utilisé pour cette étude la technique de COMANDON décrite page 8.

Utilisant différents sels minéraux et organiques de calcium, nous avons préparé, à l'aide de ceux-ci, des solutions contenant des quantités connues d'ions Ca.

Après avoir obtenu un exsudat péritonéal riche en leucocytes, nous diluons celui-ci à parties égales avec l'une des solutions du sel de calcium considéré ; le mélange étant effectué à parties égales, la surcharge en ion calcium par cm^3 était égale à la moitié du nombre de milligrammes de calcium contenu dans 1 cm^3 de la solution.

Immédiatement après avoir opéré le mélange, 1 goutte de celui-ci était portée sur une lame à la surface de laquelle avaient été, au préalable, étalés et fixés par dessiccation des grains d'amidon ; une lamelle était disposée sur la goutte, puis lutée à la paraffine ; les différentes lames ainsi préparées, le plus rapidement possible, étaient ensuite portées à l'étuve à 37°C et examinées après 1/2 heure et 1 heure afin de noter l'intensité du tactisme leucocytaire après ces deux laps de temps déterminés.

Immédiatement après le prélèvement de la goutte du mélange exsudat-solution du sel de Ca, on ajoutait à ce mélange sous un volume aussi réduit que possible, la quantité de bactéries nécessaire de façon à pouvoir après 1/2 heure d'incubation à 37°C , étalement, dessiccation et coloration, observer dans les mêmes conditions que précédemment le phénomène de phagocytose. Nous avons pour cela ajouté 0 cm^3 10 d'une suspension de staphylocoques titrant 1 milliard de bactéries par cm^3 à un cm^3 du mélange effectué à partie égale de la suspension leucocytaire et de la solution de sel de calcium à l'étude. Ainsi, le rapport nombre de bactéries restait semblable à nombre de leucocytes

celui que nous avons toujours conservé au cours de nos expériences sur la phagocytose. Nous avons utilisé ici une suspension microbienne cinq fois plus concentrée puisque le volume sous lequel nous introduisions les bactéries était cinq fois plus faible.

Cette technique nous a ainsi permis de comparer l'influence de différents sels de calcium, à teneur égale en Ca, sur, d'une part, le tactisme leucocytaire, d'autre part le phénomène de phagocytose.

Exposé des résultats relatifs à l'étude de l'influence des divers sels de calcium sur le tactisme leucocytaire -

Pour l'exposé des résultats, nous avons adopté une notation conventionnelle, car il nous était impossible de chiffrer exactement le degré du phénomène comme nous l'avons fait pour la phagocytose ; entre les deux cas extrêmes, celui où aucun leucocyte n'avait été attiré par les grains d'amidon et celui où la majorité des grains d'amidon était entourée par une ou plusieurs couronnes de leucocytes, tous les cas intermédiaires se sont présentés.

La notation suivante a été adoptée :

- aucun tactisme ne s'est manifesté,
- + quelques grains d'amidon ont attiré de rares leucocytes,
- + 1 leucocyte en moyenne par grain d'amidon
- ++ 2 à 3 leucocytes par grain d'amidon
- +++ 3 à 5 leucocytes par grain d'amidon
- ++++ tactisme très marqué ; 4 à 5 leucocytes par grain d'amidon ; certains de ces derniers sont complètement entourés d'une couronne de leucocytes.

Le tableau suivant indique les résultats obtenus, d'une part après 1/2 heure, d'autre part après 1 heure.

Résultats des expériences effectuées sur le tactisme leucocytaire

I) Lecture après 1/2 heure

surcharge en ion Ca exprimée en mg par cm ³	0	0.02	0.10	0.50	2	10
TEMOIN	++/+++					
Acétate de calcium		++/+++	+++	++/+	+/-	-
Benzoate "		+++ /++++	++++	+++	+/-	
Chlorure "		+++ /++	++++	++	+	-
Formiate "		++	+++	++	+	-
Gluconate "		+++	+++ /++++	+++	+	
Isobutyrate "		+++	++++	+ /++	+	-
Phénylbutyrate "		+++	+++	+	-	
Phénylbutylacétate		+++	+++	+	-	
Salicylate "		++	+++	+	-	

2) Lecture après 1 heure

surcharge en ion Ca exprimée en mg par cm ³	0	0.02	0.10	0.50	2	10
TEMOIN	+++					
Acétate de calcium		+++	+++ / +++++	++	+	-
Benzoate "		+++ / +++++	+++	+++	+	
Chlorure "		++++	++++	+++ / ++	+	-
Formiate "		+++	++++	++ / +++	+	-
Gluconate "		+++	++++	++++	+	
Isobutyrate "		++++	++++	++++	+	-
Phénylbutyrate "		++++	+++ / +++++	+	-	
Phénylbutylacétate "		++++	++++	++	-	
Salicylate "		++ / +++	+++	+	-	

Si l'on considère les diverses valeurs du tactisme leucocytaire correspondant aux différentes surcharges en ion calcium apportées par chaque sel, pris séparément, on peut constater que la surcharge correspondant à 0.10 mg d'ion calcium par cm³ est celle qui permet d'observer le tactisme optimal.

Si la surcharge est inférieure ou supérieure, le tactisme est diminué. Cette différence est surtout sensible lorsque l'on effectue la lecture après 1/2 heure.

Les surcharges supérieures à 1/10 de mg de calcium par cm³ amènent un ralentissement plus ou moins prononcé du tactisme leucocytaire. Le phénylbutyrate, le phénylbutylacétate, le salicylate de calcium freinent beaucoup plus rapidement le tactisme que les autres sels de calcium.

Cette différence ne peut s'expliquer à teneur égale en calcium que par la nature de l'acide salifiant le calcium. Il est à remarquer que le tactisme leucocytaire correspondant à une surcharge en ion calcium de 0.10 mg par cm³ apportée par ces trois sels n'est pas supérieur mais égal à celui observé avec une surcharge de 0.02 mg de calcium par cm³.

Exposé des résultats relatifs à l'étude de l'influence des divers sels de calcium sur la phagocytose -

Pour l'estimation de l'intensité du phénomène de la phagocytose, nous avons repris la technique précédemment décrite.

L'examen des lames a révélé parfois la présence de leucocytes altérés dont le noyau avait à peu près disparu ; le noyau de ces leucocytes semblait avoir diffusé dans le protoplasme et apparaissait beaucoup moins coloré ; dans ces cas, la lecture du tactisme avait montré des leucocytes plus ou moins profondément altérés et un tactisme toujours nul ou très rétré. L'action nocive de l'anion sur les leucocytes semble expliquer l'inhibition du tactisme et de la phagocytose.

Les leucocytes soumis à l'action du chlorure ou de l'acétate de calcium présentaient une division anormale de leur noyau ; celui-ci était constitué par 4, 5 ou 6 lobes, alors qu'en règle générale les noyaux des leucocytes observés étaient des noyaux trilobés.

Lorsque le noyau était profondément altéré, la détermination de l'index phagocytaire n'a pu être effectuée avec précision et nous avons indiqué seulement la valeur approximative du phénomène.

Le tableau ci-dessous permet de comparer les résultats obtenus avec les différents sels aux diverses concentrations envisagées :

Les chiffres donnés dans ce tableau représentent les Index phagocytaires.

Résultats des expériences effectuées sur la phagocytose

Surcharge en ion Ca (en mg par cm ³)	0	0.02	0.10	0.50	2	10
TEMOIN	4.23					
Acétate de Ca		4.8	5.1	3.9	3.4	1 à 1.5 ⁽¹⁾
Benzoate de Ca		4.2	4.4	4.9	2.9	
Chlorure de Ca		4.5	6	6.2	2.3	1 ⁽¹⁾
Formiate de Ca		4.1	5.2	6.4	3.5	1.6
Gluconate de Ca		4	3.9	4.6	5.6	
Isobutyrate de Ca		4.3	6.2	6.3	5.4	2
Phénylbutyrate de Ca		4	4.5	(leucocytes altérés (2 0.5		
Phénylbutylacétate de Ca		4.4	4.2	(leucocytes altérés (2 0.5		
Salicylate de Ca		4.9	3.9	(3.9 leuco. altérés 2		

(1) Présence de noyaux très divisés.

La lecture de ce tableau fait apparaître en général une légère augmentation de la valeur de l'index phagocytaire suivie d'une diminution plus ou moins rapide selon le sel mis en expérience.

Les valeurs maxima de l'index phagocytaire s'observent pour une surcharge en ion calcium soit de 0,10 soit de 0,50 mg par cm³.

Les trois derniers sels mis en expérience, le phénylbutyrate, le phénylbutylacétate et le salicylate de calcium, possèdent une action inhibitrice marquée sur le phénomène phagocytaire qui semble surtout due à la toxicité des anions de ces trois sels à l'égard des leucocytes. En effet, l'addition de ces trois derniers sels à des doses correspondant à des surcharges en ion calcium de 0,50 et de 2 mg de calcium par cm³ abaisse considérablement les valeurs de l'index phagocytaire ; l'examen microscopique des leucocytes en révèle l'altération. Un tel phénomène ne s'observe pas après addition à la suspension leucocytaire des solutions des autres sels de calcium utilisés en quantités telles que les surcharges en ion calcium soient identiques.

Dans le tableau exposé ci-après, nous avons fait figurer d'une part, les résultats obtenus au cours de nos expériences sur le tactisme, d'autre part, ceux obtenus au cours de nos expériences sur la phagocytose : la comparaison entre l'influence de l'ion Ca sur le tactisme leucocytaire et la phagocytose est ainsi facile à faire : (p.110).

I représente la valeur de l'index phagocytaire,

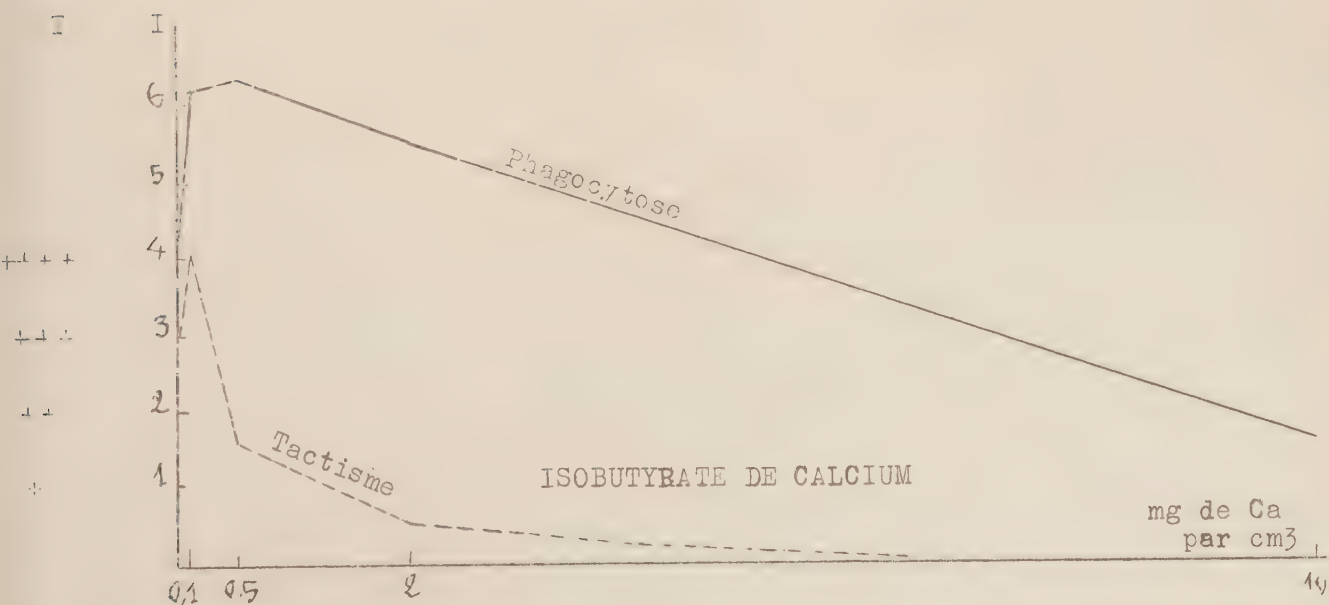
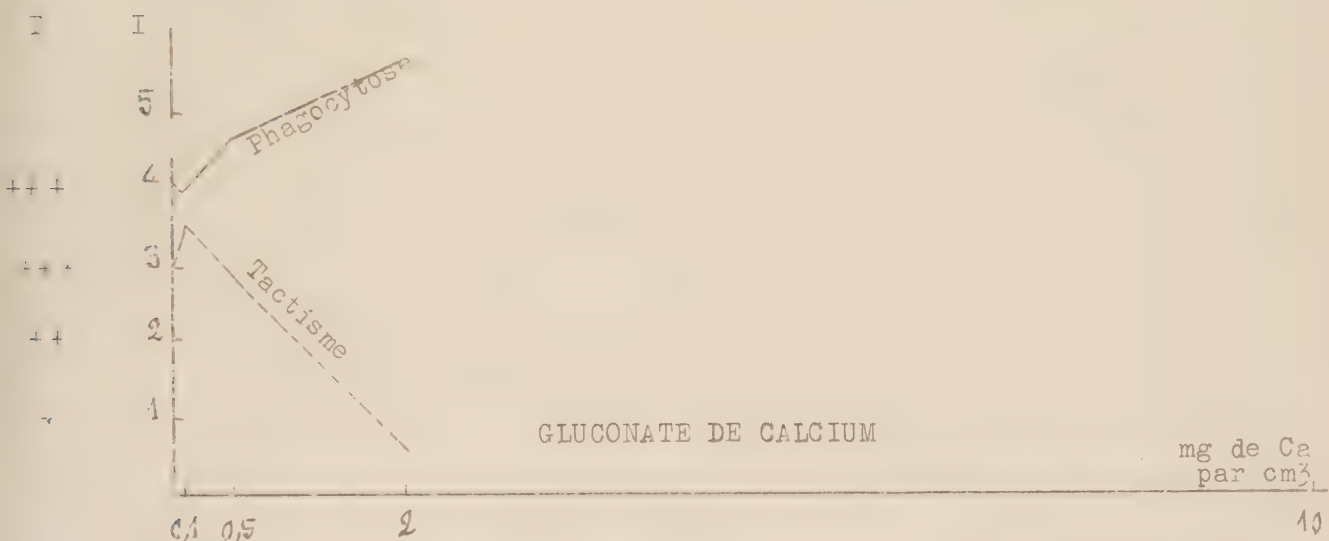
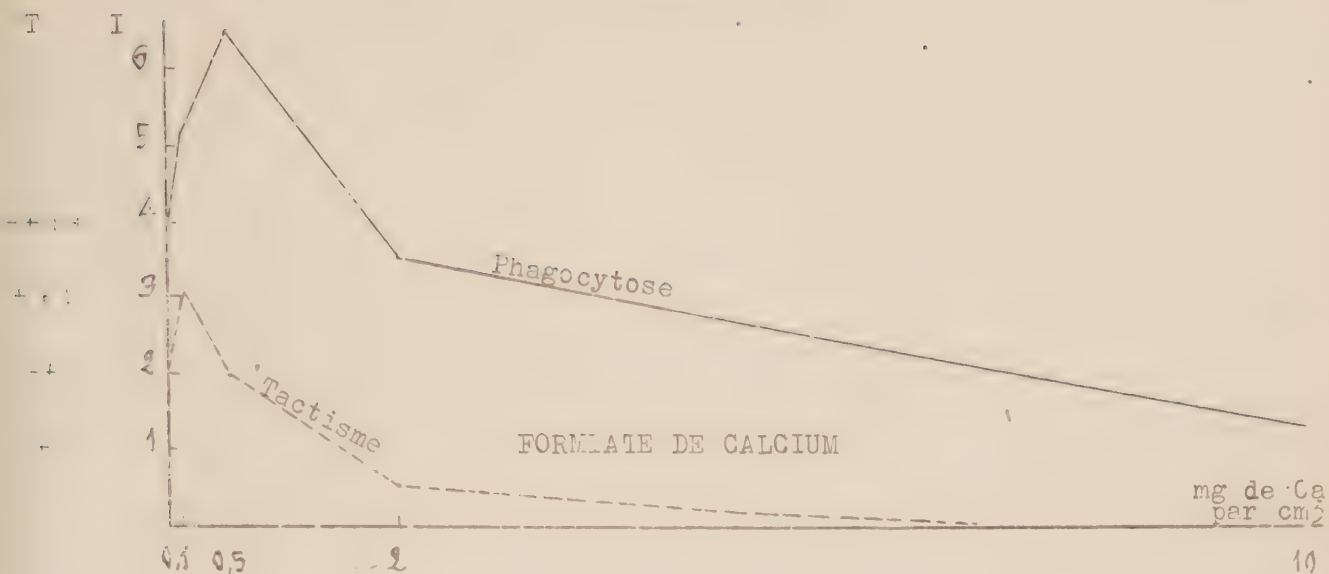
T représente l'intensité du tactisme leucocytaire.

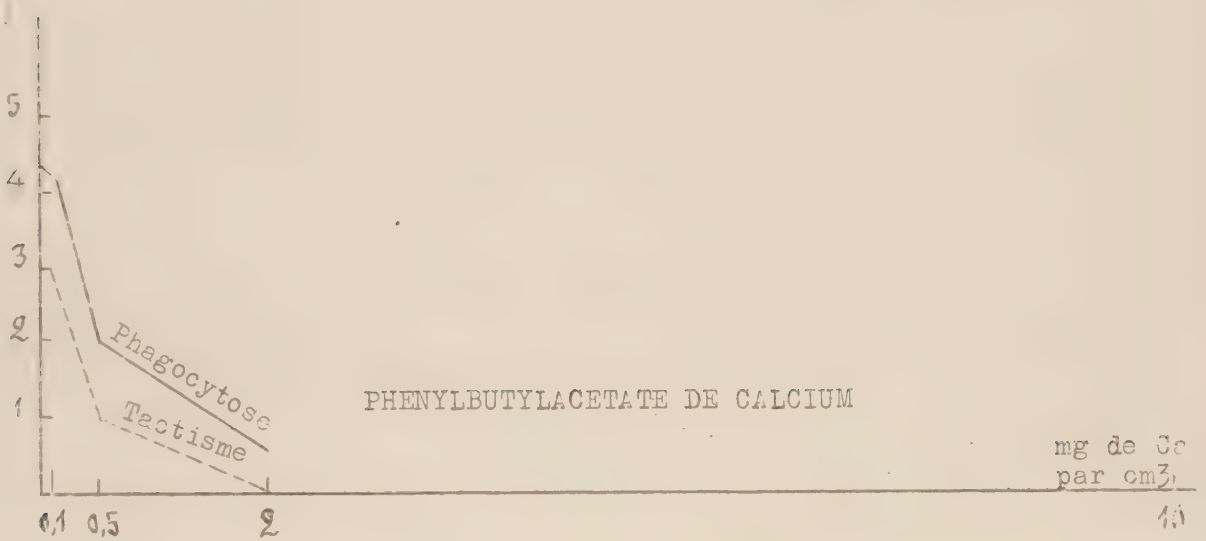
Nous avons également traduit sous forme graphique les tableaux précédents afin de mieux mettre en évidence l'influence des diverses concentrations des différents sels de calcium, d'une part sur le tactisme leucocytaire, d'autre part sur la phagocytose.

En ordonnées figurent les valeurs du tactisme leucocytaire et celles de l'index phagocytaire. En abscisses sont portées les valeurs de la surcharge en ion calcium en mg par cm³. (Voir pages 111, 112, 113).

SURCHARGE EN ION Ca (mg/cm²)

	0		0.02		0.10		0.50		2		10	
	I	T	I	T	I	T	I	T	I	T	I	T
TEMOIN	4.23	++/+++										
Acétate de Ca	4.8	++/+++	5.1	+++	3.9	++/+	3.4	+/	1 à 1,5	-		
Benzoate de Ca	4.2	+++ /++++	4.4	++++	4.9	+++	2.9	+/				
Chlorure de Ca	4.5	+++ /++	6	++++	5.2	++	2.3	±	1	-		
Formiate de Ca	4.1	++	5.2	+++	6.4	++	3.5	±	1,5	-		
Gluconate de Ca	4	+++	3.9	+++ /++++	4.6	+++	5.6	±				
Isobutyrate de Ca	4.3	+++	6.2	++++	6.3	+/++	5.4	±	2	-		
Phenylbutyrate de Ca	4	+++	4.5	+++	2	±	0,5	-				
Phenylbutylacetate de Ca	4.4	+++	4.2	+++	2	+	0,5	-				
Salicylate de Ca	4.9	++	3.9	+++	3.9	+	2	-				





Conclusion

Ces expériences quantitatives nous ont montré dans l'ensemble un certain parallélisme entre l'action des différents sels de calcium sur le tactisme leucocytaire et la phagocytose.

Avec une surcharge en ion Ca de 0.10 mg par cm³, nous avons toujours observé une augmentation du tactisme leucocytaire, sauf avec le phénylbutyrate, le phénylbutylacétate et le salicylate de calcium ; dès que la surcharge augmente, le tactisme leucocytaire tend à diminuer rapidement.

En ce qui concerne le phénomène de phagocytose, on observe dans la grande majorité des cas une augmentation de l'index phagocytaire avec des surcharges de 0.10 et 0.50 mg d'ion Ca par cm³ et ensuite une atténuation du phénomène mais celle-ci est toujours beaucoup plus lente que dans le cas du tactisme leucocytaire.

Quand on utilise le phénylbutyrate ou le phénylbutylacétate de calcium, les leucocytes sont très altérés et on constate une annulation simultanée du tactisme leucocytaire et de la phagocytose ; ceci s'explique vraisemblablement par l'action toxique propre des anions ; dans les autres cas, le phénomène de phagocytose se poursuit, alors que le tactisme leucocytaire est devenu très faible ou même nul.

Tactisme leucocytaire et phagocytose sont donc tous deux influencés par les différents sels de calcium, mais la valeur de la concentration des différents sels semble avoir une influence beaucoup plus grande sur le tactisme que sur la phagocytose qui peut encore se manifester après annulation du tactisme leucocytaire dans la mesure où les leucocytes ne sont pas trop altérés.

C O N C L U S I O N

Après avoir tout d'abord rappelé les connaissances actuelles sur le phénomène phagocytaire, nous avons rapporté les résultats de nos essais entrepris dans le but de suivre les variations de la phagocytose des bactéries préalablement cultivées en présence de quantités connues de substances inhibitrices.

Nous avons commencé par déterminer la valeur des doses antigénétiques (bactériostatiques) des diverses substances mises en expérience vis-à-vis des différentes espèces bactériennes. Nous avons ensuite cultivé ces bactéries en présence de différentes doses, toutes inférieures aux doses bactériostatiques, des différentes substances. Nous avons utilisé l'iode, le phénol, le chlorure mercurique, la pénicilline ou la streptomycine.

Les espèces microbiennes mises en essai étaient les suivantes : Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Klebsiella pneumoniae, Bacillus mesentericus ruber.

Des suspensions microbiennes en eau physiologique ont été réalisées en utilisant les bactéries qui s'étaient développées en présence de ces substances inhibitrices. Des volumes connus de ces suspensions microbiennes titrées ont été mises en présence de quantités fixées de leucocytes provenant d'exsudats péritonéaux de cobaye.

Désirant déterminer dans chaque cas la valeur de l'index phagocytaire, c'est-à-dire le nombre moyen de bactéries englobées par leucocyte, il nous fallait introduire toujours les mêmes quantités de bactéries et de leucocytes.

Nous avons donc établi les courbes d'étalonnage des densités optiques de ces suspensions en fonction des concentrations en bactéries. Ces dernières étaient déterminées selon la technique de WRIGHT FRIES.

Au cours de ces essais nous avons pu montrer que pour avoir un nombre aussi constant que possible de leucocytes, il fallait utiliser un mélange de plusieurs exsudats péritonéaux et l'ajouter immédiatement après son obtention aux suspensions bactériennes.

La détermination des valeurs des index phagocytaires nous a d'autre part permis de constater que ces valeurs étaient d'autant plus grandes que la dose de substance inhibitrice au contact de laquelle la bactérie s'était développée était plus forte. Quelle que soit l'espèce bactérienne considérée, on constate que la moyenne des valeurs maxima de l'index phagocytaire, correspondant aux différentes substances inhibitrices, triple par rapport à la valeur de l'index phagocytaire déterminée sur les bactéries témoins.

Aucune des substances mises en expérience ne semble favoriser particulièrement l'augmentation des valeurs de l'index phagocytaire.

D'après les conditions que nous avons utilisées il semble que les substances inhibitrices favorisent la phagocytose en agissant directement sur les bactéries.

Nous avons ensuite essayé de rechercher si la détermination de la valeur de l'index phagocytaire toujours longue et pénible, ne pourrait être remplacée par celle du pourcentage des leucocytes doués de pouvoir phagocytaire. Les résultats que nous avons obtenus nous ont montré que les variations des valeurs de l'index phagocytaire étaient beaucoup plus sensibles que celles du pourcentage des leucocytes actifs. Tandis que les valeurs de l'index phagocytaire varient dans un rapport de 1 à 10 à 1 à 15, la valeur des pourcentages des leucocytes actifs ne varient que dans un rapport de 1 à 4 environ. Ceci explique que lorsque les variations de la valeur de l'index phagocytaire sont faibles, la détermination du pourcentage de leucocytes actifs conduit à des résultats difficilement interprétables.

Nous avons ensuite étudié l'influence de l'âge et de la morphologie des bactéries sur le phénomène de phagocytose.

Après avoir constaté que l'âge des bactéries ne semble pas avoir de répercussion sur le phénomène phagocytaire, nous avons recherché l'évolution des modifications morphologiques des différentes bactéries soumises à l'action de doses variables, inférieures aux doses bactériostatiques, des substances inhibitrices mises en jeu.

Nous avons observé que les substances antibiotiques (pénicilline, streptomycine) provoquaient des altérations morphologiques beaucoup plus marquées que les substances antiseptiques (iode, phénol, chlorure mercurique). Des doses infimes de pénicilline (0,002 U.C. par cm³) font déjà apparaître des formes volumineuses chez le Staphylocoque ; l'action de la streptomycine permet d'observer des formes identiques mais à des doses beaucoup plus proches des doses antigénétiques.

La capsule du Pneumobacille de Friedlander est plus ou moins altérée après action des plus fortes doses des substances inhibitrices utilisées. Il est à souligner que la streptomycine possède une action particulièrement marquée. Des doses très faibles de cette substance antibiotique provoquent l'altération de la capsule du Pneumobacille de Friedlander, des doses légèrement supérieures en provoquant la disparition sans que la phagocytose apparaisse pour cela beaucoup plus marquée.

Les condensations cytoplasmiques observées sur le Bacille mesentericus apparaissent très nettes et nombreuses sous l'influence des deux substances antibiotiques mises en jeu. Elles apparaissent beaucoup plus faibles après action des substances antiseptiques. Les formes longues du Colibacille et du Bacille pyocyanique ont été notamment observées après

action de la pénicilline ; les autres substances inhibitrices mises en jeu ont montré une influence beaucoup moins nette sur la longueur de ces deux bactéries.

Nous avons ensuite étudié l'influence de la morphologie du Colibacille sur la phagocytose en prenant comme test la longueur de cette bactérie. Les leucocytes semblent phagocyter indifféremment les formes courtes ou longues des Colibacilles.

Dans le dernier stade de notre travail nous avons étudié l'influence de l'ion calcium sur la phagocytose et le tactisme leucocytaire, et recherché si cette action était modifiée par la nature de l'acide salifiant le calcium. Nous avons constaté qu'à une surcharge de 1/10 de mg d'ion calcium par cm³, quel que soit le sel utilisé, le tactisme passait par une valeur maxima. pour décroître plus ou moins rapidement par la suite, lorsque les surcharges en ion calcium augmentaient. Seule l'action propre de l'acide salifiant le calcium pouvait expliquer cette diminution plus ou moins rapide du tactisme leucocytaire. Le phénylbutyrate, le phénylbutylacetate et le salicylate de calcium ont manifesté une action particulièrement marquée que l'on peut vraisemblablement attribuer à leur toxicité pour les leucocytes. L'altération des leucocytes, que nous avons pu observer, explique que l'intensité de la phagocytose diminue très rapidement lorsque l'on ajoute au mélange bactéries-leucocytes, soit du phénylbutyrate, soit du phénylbutylacetate de calcium.

Si l'on considère l'influence de la concentration en ion calcium sur la phagocytose, on peut constater que l'intensité de ce phénomène, que traduit la valeur de l'index phagocytaire, après être passée par un maximum qui correspond à une surcharge en ion calcium soit de 0,10, soit de 0,5 mg par cm³, subit une diminution de plus en plus sensible au fur et à mesure que les surcharges en ion calcium augmentent.

L'influence de l'ion calcium apparaît beaucoup plus nette sur le tactisme leucocytaire que sur la phagocytose. Nous avons pu mettre nettement en évidence les dissociations entre phagocytose et tactisme leucocytaire, l'activité phagocytaire des leucocytes se manifestant encore avec une intensité non négligeable tandis que le tactisme leucocytaire se montrait nul.

417

358

277

215

154

104

80

54

43

Courbe d'éclatement

d'

Escherichia coli

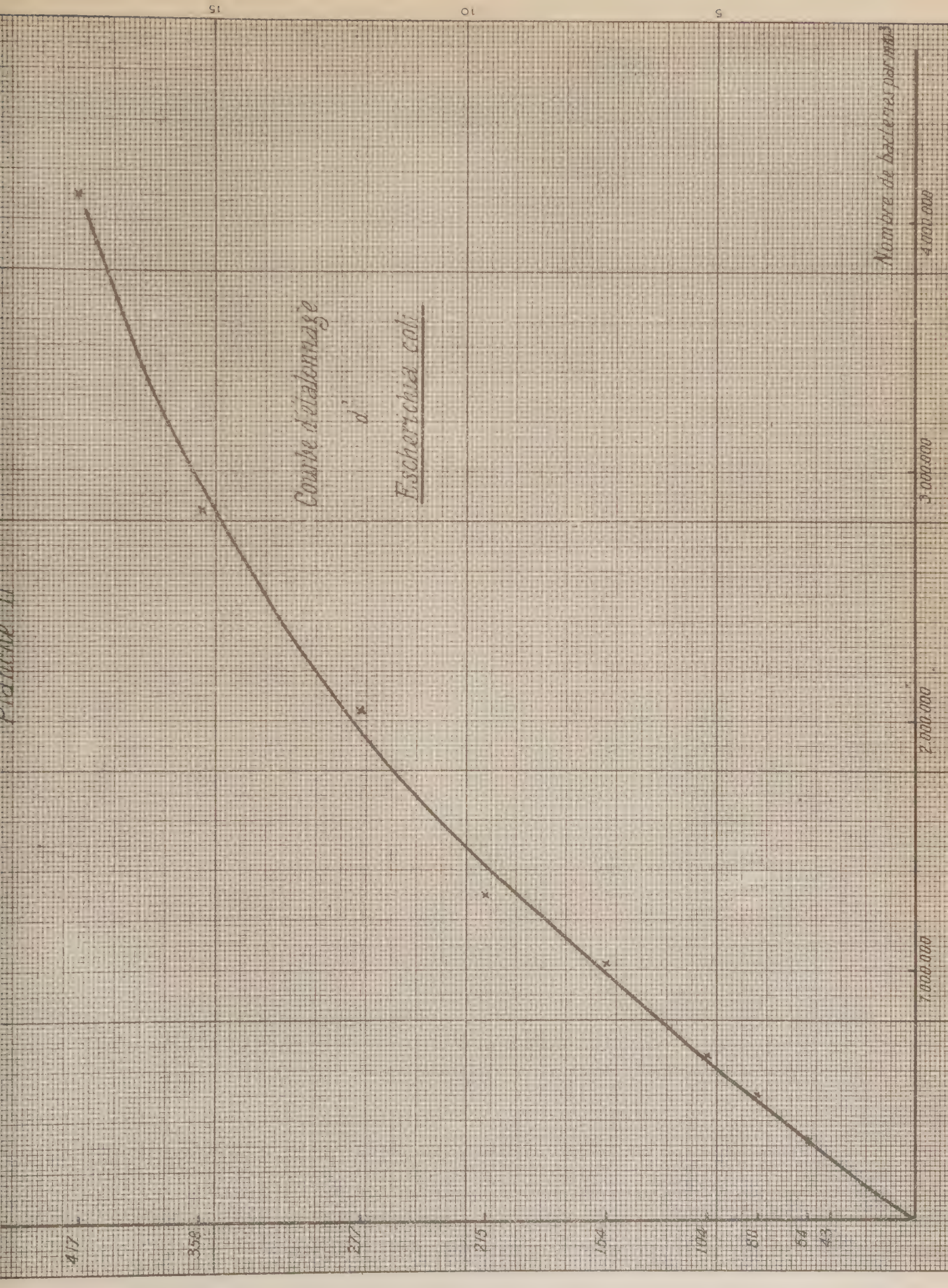
Nombre de bactéries par ml

7 000 000

2 000 000

3 000 000

4 000 000



415

278

222

166

160

85

212

48

Nombre de batteries par mm²

7 500 000

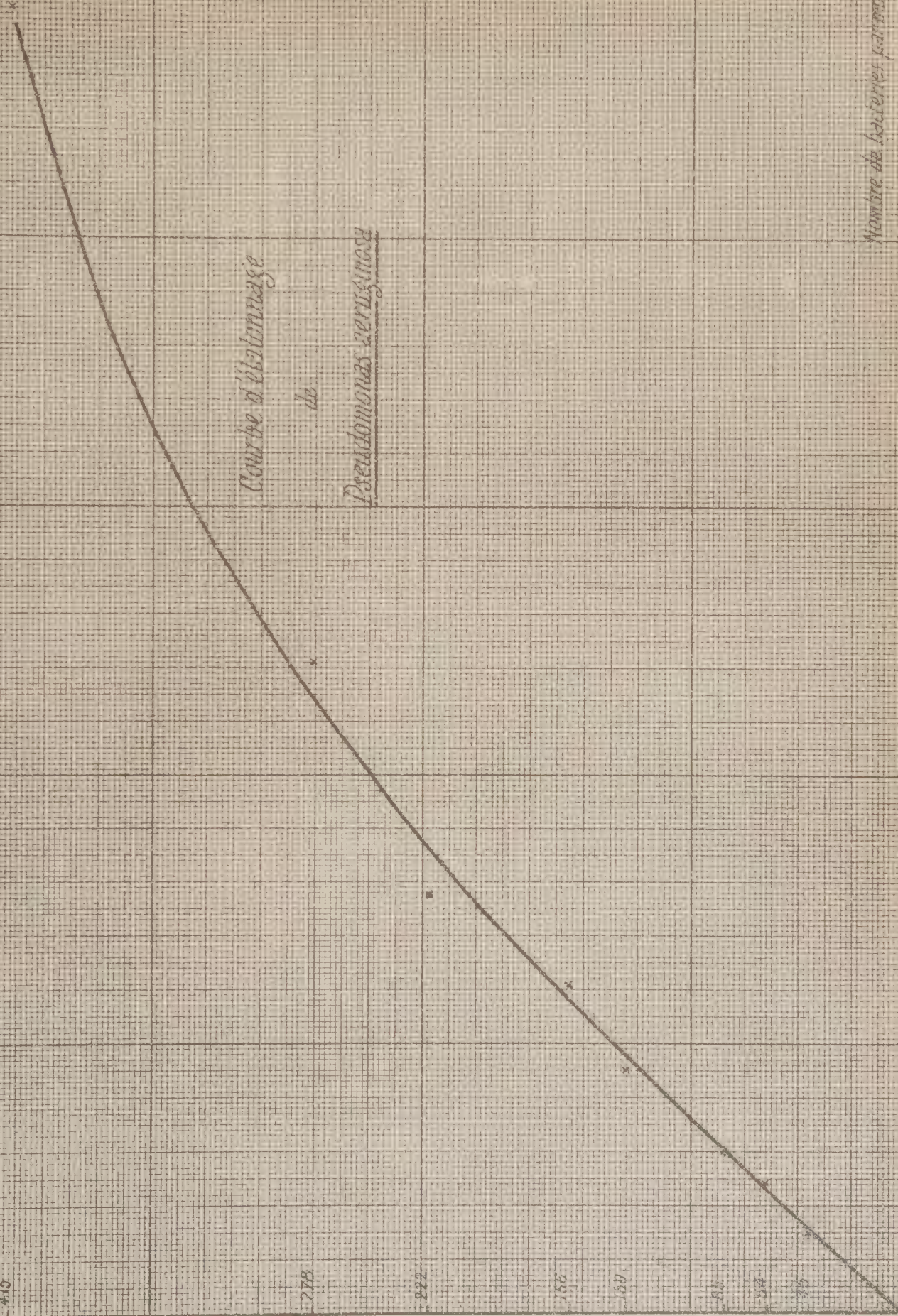
5 000 000

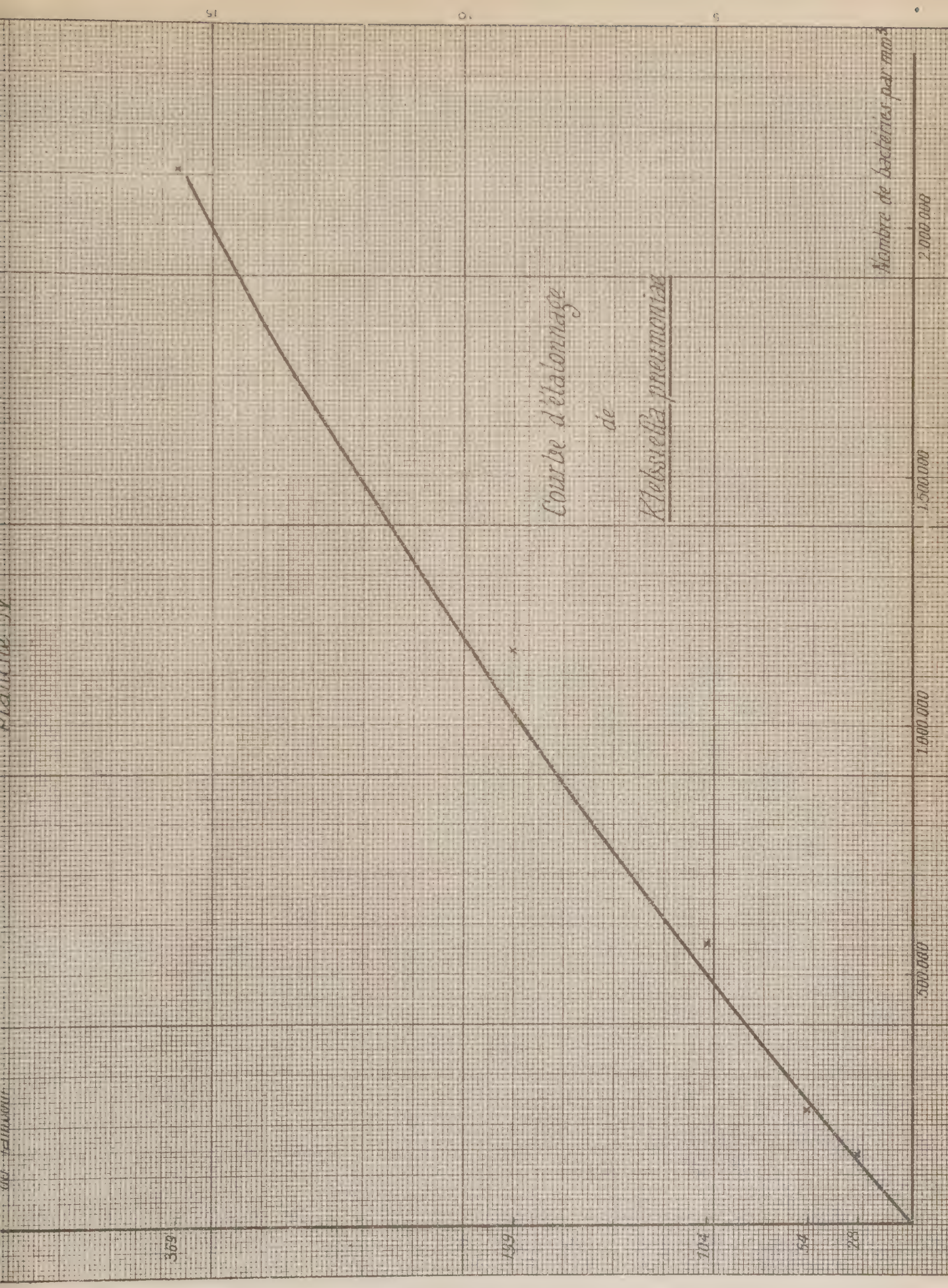
4 500 000

3 000 000

1 500 000

Courbe d'éclatage
de
Pseudomonas aeruginosa



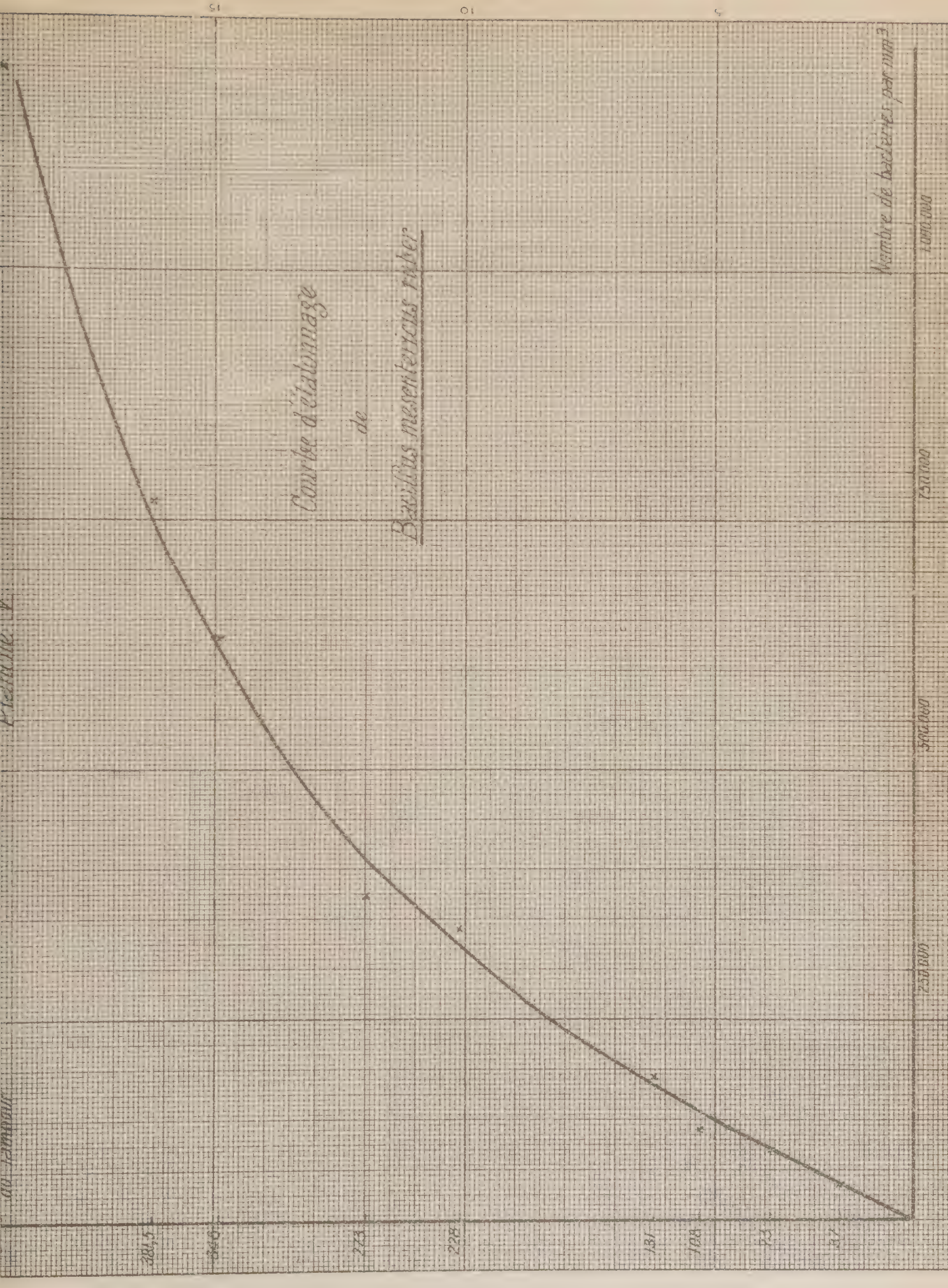


Préliminaire

du lampour

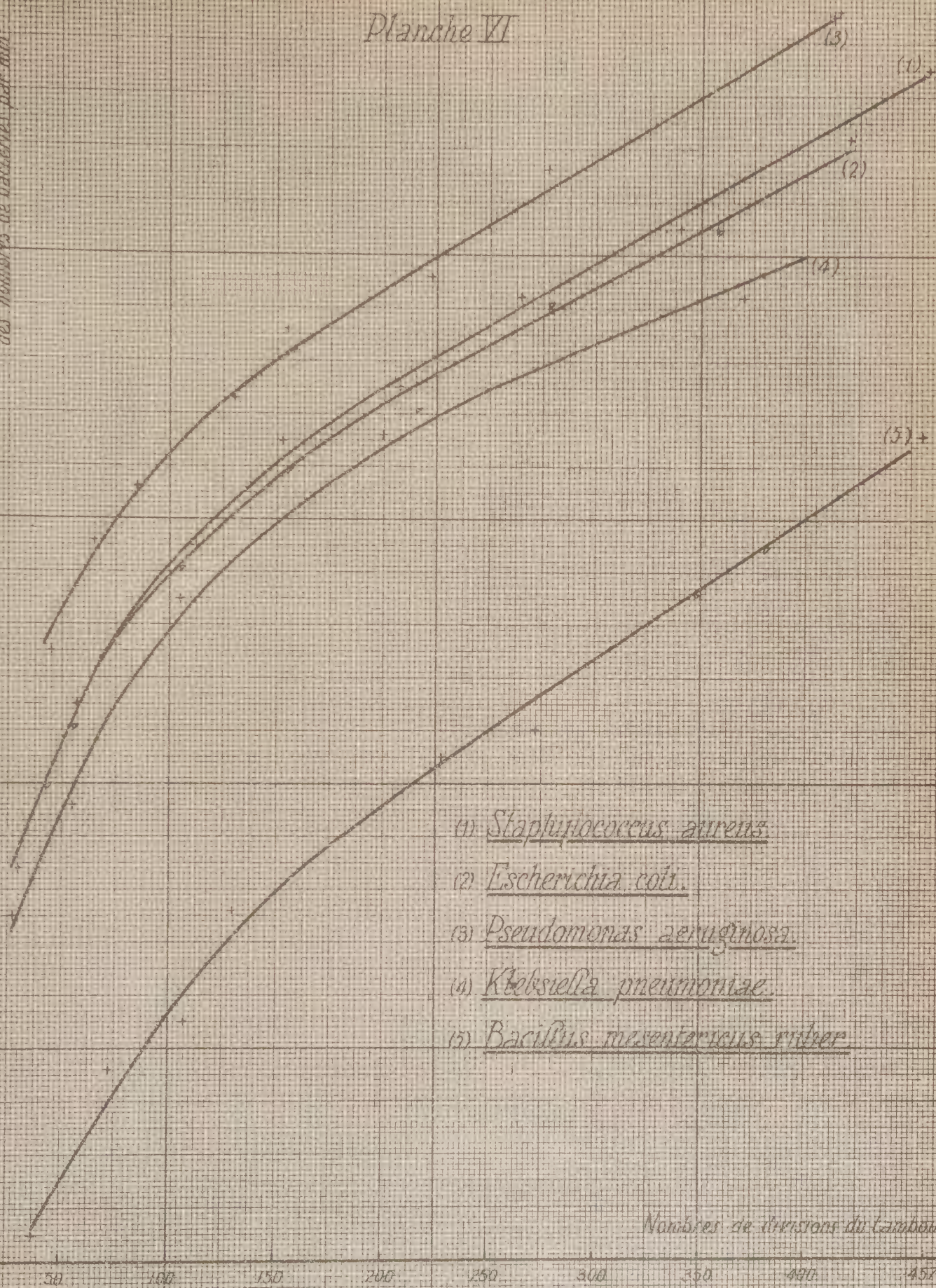
Courbe d'éclairage
de
Bacillus mesentericus raber

Nombre de bactéries par mm³



logarithmes
des nombres de bactéries par mm³

Planche VI



(1) Staphylococcus aureus

(2) Escherichia coli

(3) Pseudomonas aeruginosa

(4) Klebsiella pneumoniae

(5) Bacillus mesentericus ridleyi

Nombres de divisions du carbou

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

- 1 ABRAMSON .J.Exper.Med. (1927), 46, 987 et 1003
- 2 ALMON (L.) Bact.Rev. (1943), 7, 43
- 3 BARIKINE (W.) Zeitschr f.Immunitätsf. (1910) 8 , 72
- 4 BENETATO (G.) OPRISIU (C.) et BACIU (I.) J.Physiol (1947), 39, 191
- 5 BHATNAGAR (S.S.) Brit. J.Exper. Path. (1935), 16, 375
- 6 BIER (O.) et ROCHA e SILVA (M.) Virch. Arch. f.path. Anat.
(1939) 303, 325
- 7 BOARI (D.) Giorn. batte. e. immunol. (1938), 20, 1
(d'après Bull.Inst.Pasteur (1938), 36, 692).
- 8 BOIVIN (A.) et DELAUNAY (A.) "Phagocytose et infection" Paris 1947,
Hermann, éd.
- 9 BOIVIN (A.) et DELAUNAY (A.) Bull.Acad.Med. (1943), 127, 274
- 10 BOIVIN (A.) et DELAUNAY (A.) Rev. Immunol. (1944-1945), 2 , 1
- 11 BOIVIN (A.), TULASNE (R.) VENDRELY (R.) et MINCK (R.)
Bull. Acad.Med. (1948), 132, 37
- 12 BORDET (J.) Traité de l'immunité dans les maladies infectieuses
1939. Paris - Masson éd.
- 13 BRIGGS (D.R.) Journ. Physical Chem. (1928), 32, 1646
- 14 BRUYNOGHE (R.) et MAISIN (J.) C.R. Soc.Biol. (1922), 86, 292
- 15 CESAR (R.) Thèse Pharm. Paris 1946
- 16 CHAMBERS (L.) et GRAND. J. of Cell. a compar. Physiol (1936), 8, 1
- 17 COMANDON (J.) Ann.Inst.Pasteur (1920), 34, 1
- 18 CORFER (H.), COHN (M.) et STONER (R.) Am.Rev.Tuberc. (1945), 51, 566
- 19 CUTCHEON (Mc) Arch.Path. (1934), 17, 607
- 20 DELAUNAY (A.) Ann. Inst.Pasteur (1944), 70, 372
- 21 DELAUNAY (A.) C.R. Soc.Biol. (1943), 137 , 425
- 22 DELAUNAY (A.) Rev. Immunol. (1943), 8, 161
- 23 DELAUNAY (A.) Rev. Immunol. (1943), 8 96

- 24 DELAUNAY (A.) Rev.Immunol (1940-1941), 6, 307
- 25 DELAUNAY (A.) Rev.Immunol (1943), 8, 30
- 26 DELAUNAY (A.) C.R. Soc.Biol. (1943), 137, 209
- 27 DELAUNAY (A.) Rev. Immunol (1944-1945), 2, 218
- 28 DELAUNAY (A.) C.R. Soc. Biol. (1943), 137, 589
- 29 DELAUNAY (A.) C.R. Soc. Biol. (1943), 137, 590
- 30 DELAUNAY (A.) Rev. Immunol (1942), 7, 28
- 31 DELAUNAY (A.) Rev. Immunol (1942), 7, 33
- 32 DELAUNAY (A.) C.R. Soc. Biol. (1941), 135, 205
- 33 DELAUNAY (A.) et LEHOULT (Y.) C.R. Soc. Biol. (1942), 136, 387
- 34 DELAUNAY (A. & M.) et LEHOULT (Y.) C.R. Soc. Biol. (1942), 136, 259
- 35 DELAUNAY (A. & M.) et NICOL (L.) C.R. Soc. Biol. (1942), 136, 192
- 36 DELAUNAY (A. & M.) et PAGES (J.) C.R. Soc. Biol. (1944), 138, 432
- 37 DELAUNAY (A.) et PAGES (J.) Rev. Immunol (1946), 10, 53
- 38 DELAUNAY (A.) et PAGES (J.) C.R. Soc.Biol. (1945), 139, 557
- 39 DELAUNAY (A.) et PAGES (J.) Ann.Inst.Pasteur (1946), 72, 458
- 40 DELAUNAY (A.) et PAGES (J.) C.R.Acad. Sc. (1946), 222, 933
- 41 DELAUNAY (A.) et SARCIRON (R.) C.R. Soc.Biol. (1941, 135, 368
- 42 DELAUNAY (A.) et SARCIRON (R.) C.R. Soc. Biol. (1941), 135, 794
- 43 DELAUNAY (A.), SARCIRON (R.) et PAGES (J.) C.R. Soc.Biol.(1941),
135, 1529
- 44 DELAUNAY (A.), SARCIRON (R.) et PAGES (J.) C.R. Soc. Biol. (1944)
138, 345
- 45 DELAUNAY (A.), SARCIRON (R.), VENDRELY (R.) et LEHOULT (Y.),
Rev. Immunol (1942), 7, 134
- 46 DELAUNAY (A.) et VENDRELY (R.) C.R. Soc. Biol. (1942), 136, 642
- 47 DIENES (L.) J. of. Bact. (1949), 57, 529
- 48 DIXON (H.) et CUTCHEON (M.Mc) Proceed. Soc. Exp. Biol. a Med.
(1938), 38 378

- 49 DUBOS (R.J.) "The bacterial cell." Harvard University Press (1949)
- 50 EGGERS (H.H.) J.Infect. Dis. (1909), 6, 662
- 51 ESCHE (P.) Zeitschr. f. Immunitätsf (1939), 26, 242
- 52 EWING (J.O.) J.Pathol. a. Bact. (1946), 53, 167
- 53 FENN (W.O.) J. Gen. Physiol. (1921), 3, 439, 465 et 575
- 54 FENN (W.O.) J. Gen. Physiol. (1923), 5, 169
- 55 FENN (W.O.) J. Gen. Physiol. (1923), 5, 311
- 56 FETHKE (N.) C.R. Acad. Sc. (1939), 208, 1054
- 57 FETHKE (N.) C.R. Acad. Sc. (1939), 209, 250
- 57bis FLEISCHMANN (W.) Biochem. Z. (1928), 200, 25
- 58 GARDERE (H.) et PICHAT (P.) C.R. Soc.Biol. (1936), 121, 45
- 59 GELLHORN (E.) Neucere Ergebnisse der Physiologie, Leipzig (1926)
- 60 GELLHORN (E.) et REGNIER (J.) "La perméabilité en physiologie et en pathologie générale", 1936, Masson éd.
- 61 GLENN (J.) J.of. immunol (1946), 52, 65
- 61bis GROB (D.) J. of Gen.Physiol. (1949), 33, 103
- 62 GROS (F.), MACHEBOEUF (M.) RAMBECH (U.) et LATERRADE (C.)
Ann. Inst.Pasteur (1949), 77, 127
- 63 GROS (F.), MACHEBOEUF (M.), RYBAK (B.) et LACAILLE (P.)
Ann. Inst. Pasteur (1949), 77, 246
- 64 HAAG (F.) Zeitschr. Hyg. u. Infektionskr. (1943), 124, 636
- 64bis HAIGHT (W.F.), ROSSITER (R.J.), Blood (1950), 5, 267
- 65 HAMBURGER (H.J.) Physikalisch-Chemische Untersuchungen über
Phagocyten, Wiesbadon, 1912
- 66 HANKS (J.), J. of immunol (1940), 38, 159
- 67 HARE (R.) Brit. J. Exper. Path. -(1931), 12, 261
- 68 HARMON (D.R.), ZARAFONETTIS (C.) et CLARK (P.F.)
J.of Bact. (1946), 51, 626
(1946), 52, 387
(1947), 53, 343
- 69 HEKTOEN (L.) et RUEDIGER J.Infect.Dis. (1905), 2, 128

- 70 HENSCHEL (A.), Proceed. Soc. Exp. Biol. a. Med. (1940), 44, 230
- 71 d'HERELLE (F.) "Le Bactériophage et son comportement" (1926),
Paris - Masson éd.
- 72 HOBER (R.) Physikalische Chemie der Zelle und der Gewebe,
Leipzig (1926).
- 73 HOBER (F.) Zeitschr. f. Immunitätsf (1934), 84, 46
- 74 ISCHIMOTO (Y.) Centralbl. f. Bakt. (1928), 109, 100
- 75 JOLLY (J.) C.R. Soc. Biol. (1913), 74, 504
- 76 KANAI (T.) Pflugger's Arch. (1923), 168, 401
- 77 KOLLATH (W.) et RAABE (F.) Centralbl. f. Bakt. (1943), 149, 434
- 78 KRITSCHESKI (J.) et AWRECH (W.W.) Zeitschr. f. Immunitätsf.
(1933), 80, 28
- 79 LAMBIN (S.) Thèse D^t. es-Sciences - Masson éd., Paris 1933
- 80 LASEARGUES (E.) et DELAUNAY (A.) C.R. Soc. Biol. (1946), 140, 455
- 81 LATERRADE (C.) et MACHEBOEUF (M.) Ann. Inst. Pasteur (1950), 78, 753
- 82 LEBRUN-POGES (J.) et ROPIELUX (R.) Ann. Inst. Pasteur (1950), 72, 418
- 83 LECOMTE DU NOUY (P.) Catalogue du Musée Pasteur n° 8, p.29 (Stras-
bourg 1922) (d'après Ann. Inst. Pasteur (1936), 56, 359
- 84 LEDINGHAM (J.C.G.) Proceed Roy Soc. Séries B (1908), 80, 188
- 85 LE FEVRE de ARRIC (M.) C.R. Soc. Biol. (1921), 85, 671
- 86 LE FEVRE de ARRIC (M.) C.R. Soc. Biol. (1922), 86, 968
- 87 LEISHMAN (W.B.) Brit. Med. J. (1902), 1, 73
- 88 LEVADITI (C.) "La pénicilline et ses applications thérapeutiques"
(1945), Paris - Masson éd.
- 89 LEVADITI (C.) C.R. Soc. Biol. (1918), 81, 1064
- 90 LEVADITI (C.) et HENRY (J.) Rev. Immunol (1948), 12, 193
- 91 LEVADITI (C.) et MUTERMILCH (S.) C.R. Soc. Biol. (1910), 68, 1079
- 92 LEVADITI (C.) et VAISMAN (A.) C.R. Soc. Biol. (1938), 128, 463
- 93 LEVADITI (C.) et VAISMAN (A.) Bull. Acad. Med. (1945), 129, 564

- 94 LEVADITI (C.), VAISMAN (A.), HENRY EVELIN (J.) Bull. Acad. Med.
(1950), 134, 369
- 95 LEVADITI (C.), VAISMAN (A.) et KRASSNOFF (A.) Bull. Acad. Med.
(1938), 119, 553
- 96 LEVADITI (C.), VAISMAN (A.) et KRASSNOFF (A.) C.R. Soc. Biol.
(1938), 127, 22
- 97 LEVADITI (C.) et VEILLET (J.) Rev. Immunol (1947), 11, 206
- 98 LOOS (H.O.) Zeitschr. ges. exp. Med. (1931), 75, 463
- 99 LUCHE (B.), STRUMIA (L.), RUDD (S.), CUTCHEON (B.Mc) RUDD (B.H.E.),
J. of Immunol (1933), 24, 455
- 100 LUDANY (G.), BERTA (L.) et GYORY (G.) Zeitschr. f. Immunitätsf
(1938), 94, 35
- 101 MADSEN (T.) et WULFF (O.) Ann.Inst.Pasteur (1919), 33, 437
- 102 MASSART (J.) Ann. Inst.Pasteur (1892), 6, 321
- 103 MESSINA (L.) et VERGA (G.) Giorn. batt. e Immunol (1937), 19, 851
(d'après Bull. Inst. Pasteur (1938), 36, 278)
- 104 METCHNIKOFF (E.) Ann. Inst. Pasteur (1888), 2, 289
- 105 METCHNIKOFF (E.) Ann. Inst. Pasteur (1890), 4, 65
- 106 METCHNIKOFF (E.) Ann. Inst. Pasteur (1891), 5, 465
- 107 METCHNIKOFF (E.) Ann. Inst. Pasteur (1892), 6, 289
- 108 METCHNIKOFF (E.) Ann. Inst. Pasteur (1895), 9, 433
- 109 MIELNIK-KOSMIDERSKI (S.) Zeitschr. f. Immunitätsf (1930), 95, 238
- 110 MINCK (R.) et MINCK (A.) C.R. Acad. Sc. (1949), 228, 279
- 111 MUDD (S.) J. of Immunol. (1934), 26, 447
- 112 MUDD (S.), CUTCHEON (B.Mc) et LUCKE (B.) Physiol. Rev. (1934), 14, 210
- 113 MUDD (S.), LUCKE (B.) et STRUMIA (L.) J. of Immunol (1933), 24, 493
- 114 NACCARI (A.) Giorn. batt. e. immunol (1938), 20, 1042
(d'après Bull.Inst.Pasteur (1938), 37, 233)
- 115 NELSON (A.R.) J. of Immunol. (1928), 15, 43
- 116 NEUFLED (F.) Arb. a. d. Kais. Gesundh (1910), 34, 266

- 116 NEUFLED (F.), ETINGER-TELMAN (R.), Centralbl. f. Bakt (1929)
114, 252
- 116bis OPIE (E.L.) Physiol. Rev. (1922), 2, 552
- 117 PETERSSON (A.) Zeitschr. f. Immunitätsf (1943), 102, 432
- 118 PIKE (M.) J. of Immunol (1934), 26, 69
- 119 PRIESTLEY (F.W.) Vet. Rec. (1938), 50, 1793
- 119bis REGNIER J. et Coll. C.R. Soc. Biol. 1936 à 1945
- 120 RITOSSA (P.) Pediatra (1937), 45, 1
(d'après Bull. Inst. Pasteur (1937), 35, 1046)
- 121 RITOSSA (P.) et NIRSCH (I.) Ann. d'Ig. (1935), 45, 221
(d'après Bull. Inst. Pasteur (1938), 36, 454)
- 122 ROBERTSON (O.) et Van SLANT (H.) J. of Immunol (1939), 37, 570
- 123 ROBINEAUX (R.) Sem. des Hôpit. Paris 14 Mars 1951, p.848
- 124 ROCHA e SILVA et BIER (O.) C.R. Soc. Biol. (1938), 129, 1138
- 125 RUBINSTEIN (P.L.) Klin.Voch (1933), 12, 507
- 126 SALTON (M.R.J.), HORNE (R.W.) et GOSSLETT (U.E.) J. gen.Microb.
G.B. (1951), 5, 405
- 127 SEGUIN (L.) These Pharmacie Paris 1926
- 128 SHANAHAK (A.) et TANNER (F.) J. of Bact. (1948), 55, 537
- 129 SIA (R.H.P.) J. Exper. Med. (1926), 43, 633
- 130 SMITH (G.H.) J. of. Immunol. (1928), 15, 125
- 131 SPINK (W.W.) Proceed. Soc. Exp. Biol. Med. (1939), 40, 549
- 132 TABUSSO (L.) Pensiero Medico (1932), n° 3, 65
(d'après Bull. Inst. Pasteur (1933), 31, 363)
- 133 TALLO (F.) et PARRINO (G.) Giorn. batt. e immunol. (1936, 16, 761
et 796 - (d'après Bull. Inst.Pasteur (1937), 35, 281.)
- 134 TULASNE (R.) C.R. Soc. Biol. (1949), 143, 286
- 135 TULASNE (R.) et MINCK (R.) C.R.Acad.Sc.(1948), 226, 2186
- 136 TULASNE (R.) et VENDRELY (R.) Nature (1948), 161, 316
- 137 TUNNICLIFF (R.) J. Inf. Dis. (1939), 64, 59

- 138 TUNNICLIFF (R.) J. Inf. Dis. (1931), 48, 161
- 139 TUNNICLIFF (R.) J. Inf. Dis. (1940), 66, 148
- 140 WEDEN Arch. Journ. exper. Path. u. Pharmak (1933), 172, 161
- 141 WEINBRENNER (K.) Zeitschr. f. immunitätsf. (1934), 83, 437
- 142 WELSH (M.) NIHOUL (E.) et DELEMMENNE-JAMINON (C.) C.R. Soc. Biol.
(1948), 142, 1452
- 143 WITTENBERG (J.) LEDERER (M.) et MOLLOV (M.) J. of. immunol (1933),
24, 135
- 143bis WONG (E.) Nature (1951), 168, 81
- 144 WRIGHT (A.E.) Proceed Roy. Soc. (1942), 35, 161
- 145 WRIGHT (A.E.) et DOUGLAS (S.R.) Proceed Roy. Soc. Séries B
(1904), 72, 357
- 146 WRIGHT (A.E.) et REID (S.T.) Proceed Roy. Soc. Séries B (1906)
77, 211
-

